ORSAY
n° d'ordre : 2582

UNIVERSITE DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

THESE

présentée

Pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR D'ETAT

SPECIALITÉ : *SCIENCES PHYSIQUES*

PAR

M. JOURNEAUX Roger

SUJET : *ETUDE PHOTOPHYSIQUE DE LA CHLOROPHYLLE ET DE PIGMENTS CHLOROPHYLLIENS DANS DES SYSTEMES ORGANISES.*

soutenue le *28 mai 1982* devant la Commission d'examen

MM. *A. MARECHAL* PRÉSIDENT
J. FAURE
J. PROST
E. ROUX
R. VIOVY

ORSAY
n° d'ordre : 2582

UNIVERSITE DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

THESE

présentée

Pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR D'ETAT

SPECIALITÉ : *SCIENCES PHYSIQUES*

PAR

M. JOURNEAUX Roger

SUJET : *ETUDE PHOTOPHYSIQUE DE LA CHLOROPHYLLE ET DE PIGMENTS CHLOROPHYLLIENS DANS DES SYSTEMES ORGANISES.*

soutenue le *28 mai 1982* devant la Commission d'examen

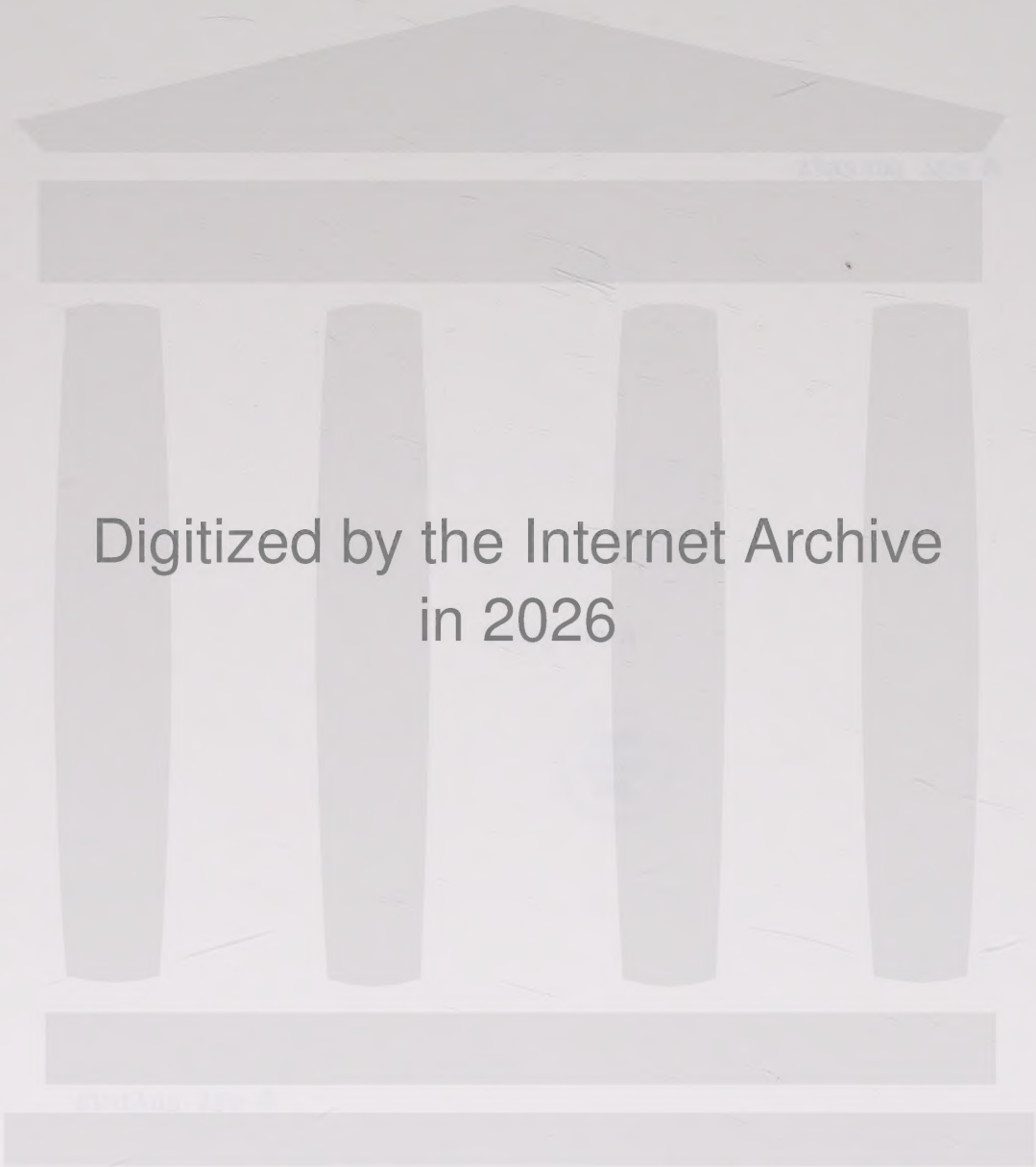
MM. *A. MARECHAL* PRÉSIDENT
J. FAURE
J. PROST
E. ROUX
R. VIOVY

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A mes parents

A ma femme

A mes enfants


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543523_0023

Que Monsieur le Professeur MARECHAL, qui a accepté de juger ce travail et de présider le Jury recoive ici l'expression de ma respectueuse gratitude. Monsieur le Professeur FAURE a bien voulu lire avec attention ce mémoire et a accepté d'en être le rapporteur, qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance. Qu'il me soit également permis de remercier Monsieur ROUX qui a examiné ce mémoire avec soin et m'a conseillé pour son amélioration. Monsieur PROST m'a apporté à plusieurs reprises ses encouragements et sa compétence sur la partie concernant les cristaux liquides ; qu'il en soit ici vivement remercié.

Je remercie ici tous mes collègues du Laboratoire pour l'amicale ambiance qu'ils ont su créer et conserver. Mes remerciements vont en particulier à Monsieur le Professeur VIOVY qui m'a accueilli dans son laboratoire, m'a guidé tout au long de ce travail et m'a permis de le mener à bien.

Je remercie les collaborateurs de recherche du Laboratoire sans qui ce travail n'aurait pu être réalisé. Je remercie particulièrement Madame HOCHAPFEL pour sa compétence et sa contribution efficace, Mademoiselle VILLAIN pour la qualité des pigments qu'elle a mis à ma disposition, et Monsieur CHENE pour sa précieuse aide expérimentale.

Je remercie tous les personnels du Service pour leur dévouement et la qualité de leur collaboration. Je pense en particulier au personnel de l'Atelier et à son responsable Monsieur OLLIVRY pour le soin et la patience avec lesquels il a réalisé la partie appareillage. Je remercie Madame LAURENT pour la frappe de ce mémoire et Madame THORAVAL pour la mise au point définitive.

Enfin, je remercie tout le personnel du service Reprographie et Madame BEAUPERE pour la reproduction et la mise en place définitive du mémoire.

P L A N

CHAPITRE I - GENERALITES 1

I Organisation de l'appareil photosynthétique 1

II Propriétés spectroscopiques des pigments in-vivo 2

II.1. Absorption

II.2. Fluorescence

II.3. Etats triplets

III Propriétés spectroscopiques des pigments in-vitro 8

III.1. Généralités

III.2. Propriétés des chlorophylles in-vitro

IV Directions d'étude 18

CHAPITRE II - METHODES EXPERIMENTALES

I Préparation des produits 24

I.1. Pigments végétaux

I.2. Cristaux liquides et colorants

II Techniques expérimentales 25

II.1. Spectres d'absorption

II.2. Exploitation des résultats

II.3. Etats triplets

II.4. Spectres de fluorescence

II.4.1. Principe des corrections

II.4.2. Réalisation

II.4.3. Résultats expérimentaux

CHAPITRE III - ETUDE DE FORMES AGREGEES

I Etude dans les mélanges binaires 42

I.1. Etude par absorption
I.2. Etude par fluorescence
I.3. Etude des états triplets
I.4. Etude par diffusion de la lumière
I.5. Discussion

II Etude dans les milieux apolaires 67

II.1. Préparation des solutions
II.2. Etude théorique
II.3. Recherche du nombre d'espèces
II.3.1. Principe
II.3.2. Exemples
II.4. Etude par fluorescence et absorption
II.5. Etude par absorption
II.5.1. Principe de la méthode
II.5.2. Résultats expérimentaux
II.5.3. Calcul de la constante d'équilibre de dimérisation
II.6. Etude des états triplets
II.7. Structure du dimère

CHAPITRE IV - ETUDE EN MILIEU ORIENTE

I Préparation du milieu 110

I.1. Etats du milieu cristal liquide
I.2. Techniques d'orientation

II Propagation de la lumière dans un cristal liquide 113

II.1. Définition et notations
II.2. Propagation dans un nématique
II.3. Propagation dans les cholestériques ou les nématiques tordus
II.4. Résultats numériques
II.4.1. Etude de l'intensité transmise
II.4.2. Etude de polarisation de la lumière transmise

III Application au pigments végétaux 146

III.1. Résultats expérimentaux

III.2. Interprétation des résultats

CONCLUSION

CHAPITRE I - GENERALITES

La photosynthèse est la transformation de l'énergie lumineuse en énergie physico-chimique, point de départ de la synthèse des composés biologiques les plus variés à partir de composés simples (CO_2, H_2O...).

Le phénomène de départ = captation et transport de l'énergie d'excitation est fondamental, et sa connaissance est essentielle pour la compréhension du processus. A un moment où se posent les problèmes d'énergie et de production alimentaire, la perspective d'utilisation de la photosynthèse rend nécessaire la parfaite connaissance du phénomène.

Les études photo-physiques et photo-chimiques liées au processus primaire sont donc importantes et ont fait l'objet de nombreuses recherches. In vivo, elles consistent à étudier la suite des réactions mises en jeu dans l'appareil photosynthétique. In vitro, elles consistent à réaliser des modèles permettant, par analogie, d'expliquer les phénomènes observés.

On sait depuis longtemps que l'absorption de l'énergie lumineuse par les organismes photosynthétiques est réalisé par plusieurs pigments absorbant dans des régions différentes du spectre. Les chlorophylles constituent la famille la plus importante ; elle comprend la chlorophylle a (Chla), la chlorophylle b (Chlb) dans les plantes vertes ; la bactério chlorophylle, les chlorobium chlorophylle, chlorophylles c et d etc... dans différentes algues et bactéries. La chlorophylle a, présente chaque fois que l'oxygène moléculaire est en jeu, est de loin le pigment le plus fondamental.

I. Organisation de l'appareil photosynthétique.

Les pigments responsables de l'absorption de la lumière ne sont pas distribués au hasard. Ils sont regroupés au niveau de membranes des chloroplasts (thylakoïdes) et liés à d'autres substances : cytochromes, quinones, lipides, protéines... Depuis les premiers travaux de Emerson (Emerson et Arnold 1932) on sait que quelques centaines de molécules de pigment formant "antenne" sont nécessaires pour capter un photon. Cette énergie lumineuse est transférée à un groupe de molécules de chlorophylle a fortement agrégées jouant le rôle de piège à énergie. C'est au niveau de ce centre réactionnel que s'opère la transformation énergie lumineuse - énergie chimique par inter-

vention d'un couple donneur - accepteur. Il est généralement admis que le centre réactionnel est constitué par deux molécules formant un dimère spécial (KATZ, NORRIS 1973). L'unité fondamentale ainsi définie constitue l'unité photosynthétique ; c'est la plus petite unité capable de donner lieu à une réaction photochimique. (Fig. I.1).

D'autre part, depuis les premiers travaux de Emerson (Emerson 1958) de nombreuses études ont montré que le transfert d'électrons entre H_2O et CO_2 a lieu en deux temps par l'intervention de deux photosystèmes ayant leurs propriétés spécifiques : nature des pigments, longueurs d'onde efficaces. La figure I.2. représente en résumé les différentes étapes et leurs niveaux énergétiques. Certains intermédiaires, en particulier l'accepteur primaire Z, sont encore mal connus.

II. Propriétés spectroscopiques des pigments in vivo.

Une approche des phénomènes liés à la photosynthèse est l'étude des propriétés spectroscopiques des pigments, en particulier des chlorophylles. On peut distinguer deux types d'études :

- études statiques : spectres d'absorption et d'émission, spectres d'action de fluorescence, résonance paramagnétique électronique.

Elles renseignent sur l'état du pigment, en particulier sur son environnement et sa participation à une réaction.

- études dynamiques : durée de vie des états excités, temps de montée ou descente de fluorescence, rendements quantiques.

Elles renseignent sur les cinétiques, les propriétés dynamiques du système, le taux de participation du pigment aux réactions.

II.1. Absorption

La bande d'absorption située dans le rouge (600 - 700 nm) est la plus intéressante car elle correspond aux longueurs d'onde les plus efficaces pour la photosynthèse. Cette bande est large avec de nombreux épaulements traduisant une structure complexe. (Fig. I.3.). Cette structure a pu être résolue par diverses techniques:

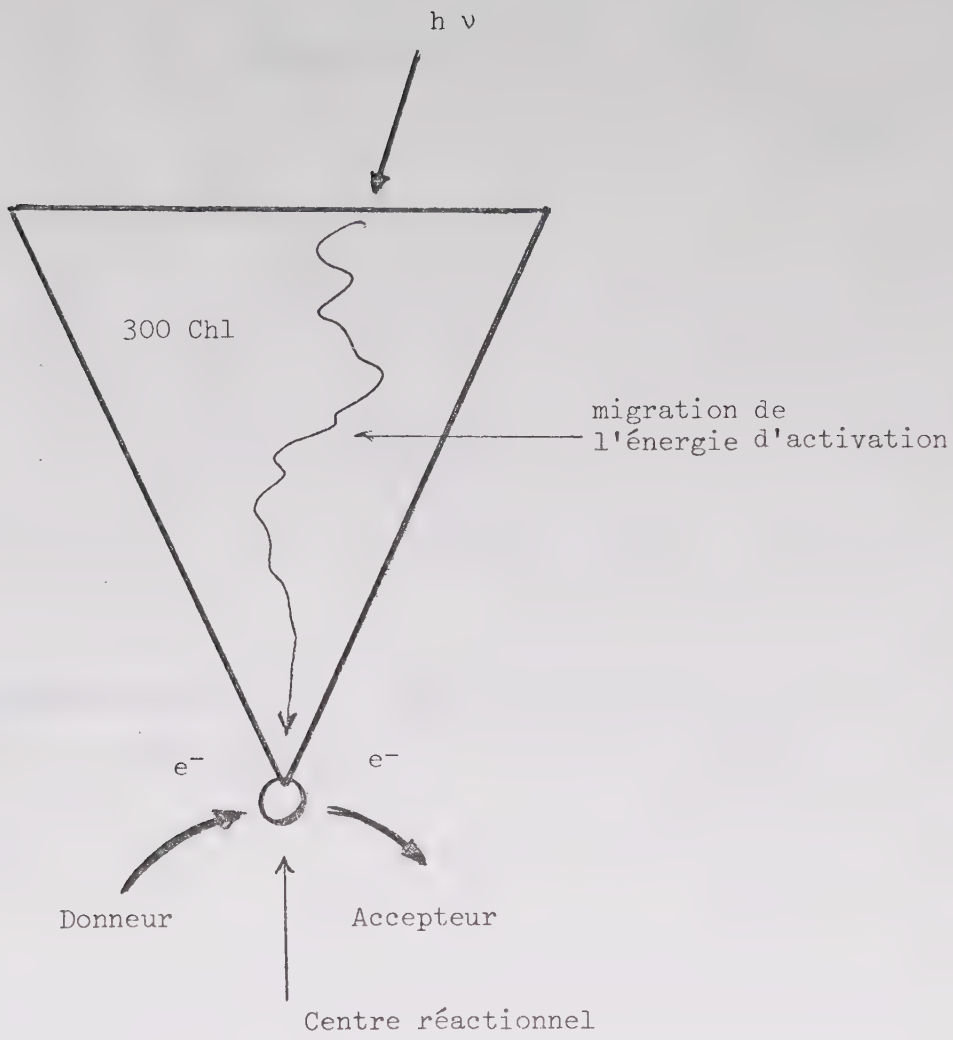


Fig. I. 1 - Représentation schématique de l'unité photosynthétique.

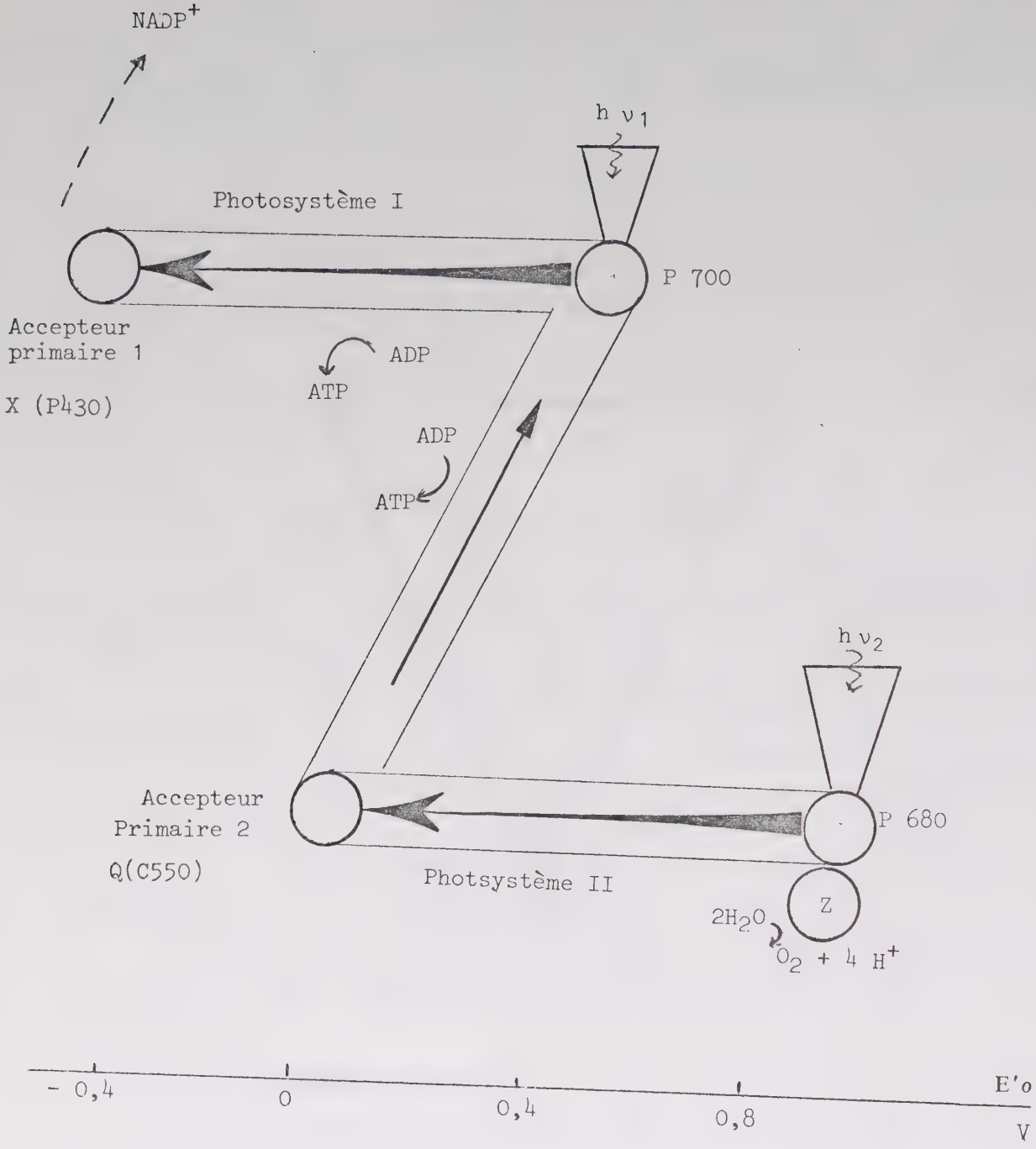
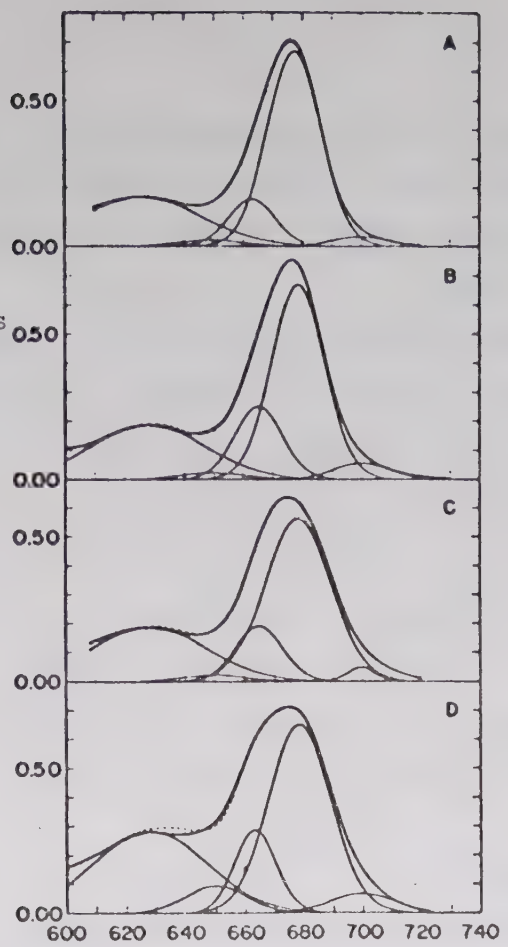


Fig. I. 2 - Schéma en Z du flux électronique dans la photosynthèse
P 700 et P 680 : pièges à énergie des systèmes I et II
Z : complexe donneur d'électrons du système II



Tribonema aequale

S. Lividus HP 700

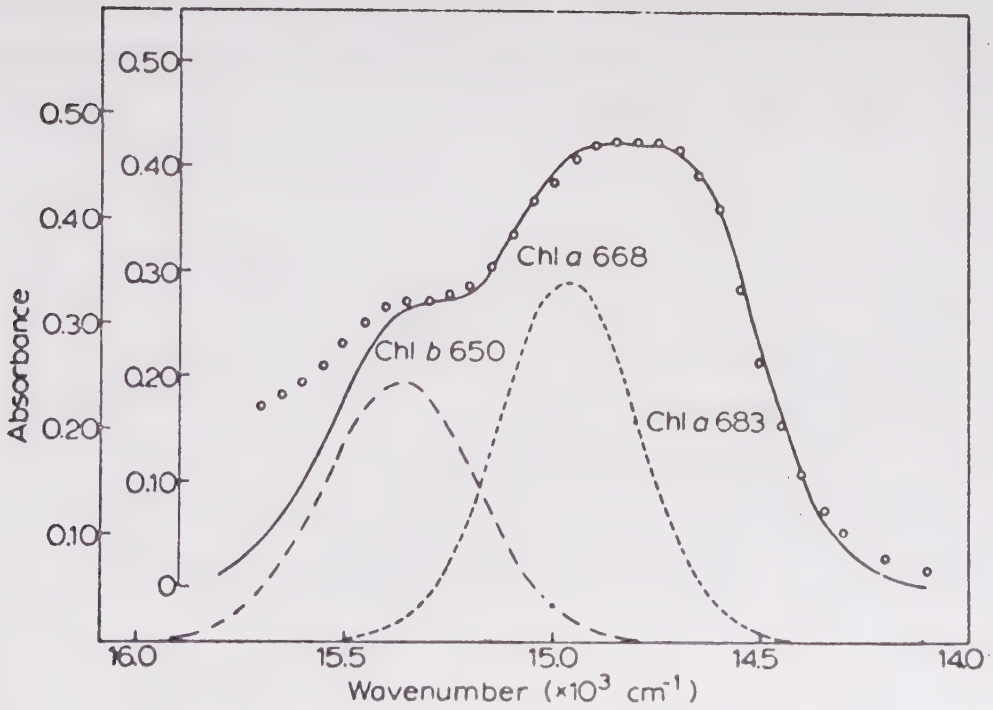
A. variabilis HP 700

Chla . n Hexane

C= 10^{-1} M.

ɔmparaison des déconvolutions
ı vivo et in vitro
ı'après COTTON et al 1974)

Fig. I. 3 - Structure de la bande rouge des chlorophylles in vivo



Résolution de la bande rouge de Chlorella

(d'après CEDESTRAND et al 1966)

- étude aux basses températures où les bandes sont plus fines et mieux résolues (FREI 1962 ; BUTTLER et HOPKINS 1970) ;

- déconvolution de la bande en différentes gaussiennes (CEDERSTRAND et al. 1966)

Cette étude a permis de préciser deux formes de chlorophylle a et une forme de chlorophylle b. Elle a également permis de comparer les spectres in vivo avec les spectres des formes agrégées (oligomères) de la chlorophylle dans certains milieux apolaires (COTTON et al. 1974).

- déconvolution et dérivation des spectres

Plusieurs formes spectrales ont été mise en évidence : trois pour Chla et une pour Chlb (BROWN et FRENCH 1959) quatre pour chla (FRENCH et al 1972).

- dérivations sucessices des spectres (CRAMER et BUTTLER 1968, GULAYEV et LITVIN 1970, BUTTLER et HOPKINS 1970).

C'est également par l'étude des spectres d'absorption qu'il a été montré que les formes chlorophylliennes sont indépendantes dans une large mesure de l'environnement lipoprotéinique, en particulier des chaînes peptidiques associées aux chlorophylles dans les chloroplastes (ACKER et DURANTON 1975).

Les variations d'absorption du système photosynthétique excité par des flashes isolés ou répétitifs ont permis d'étudier les différentes étapes des deux systèmes I et II (WITT 1975) ; en particulier le rôle et les propriétés des deux formes de pigments P 700 et P 680 liés aux deux systèmes, ont été précisé par cette technique.

II.2. Fluorescence

Bien que faible, l'émission de fluorescence due à la chlorophylle a a été l'objet de nombreuses études (GOEDHEER 1972).

A la température ordinaire, la bande principale se situe vers 680 nm avec un épaulement vers 740 nm. A basse température, la structure est plus complexe et il est possible de différencier les émissions dues aux systèmes I et II (PAPAGEORGIOU 1975) (Fig. I.4.). Du point de vue cinétique, l'émission de fluorescence est variable au cours d'une illumination constante (effet KAUTSKY).

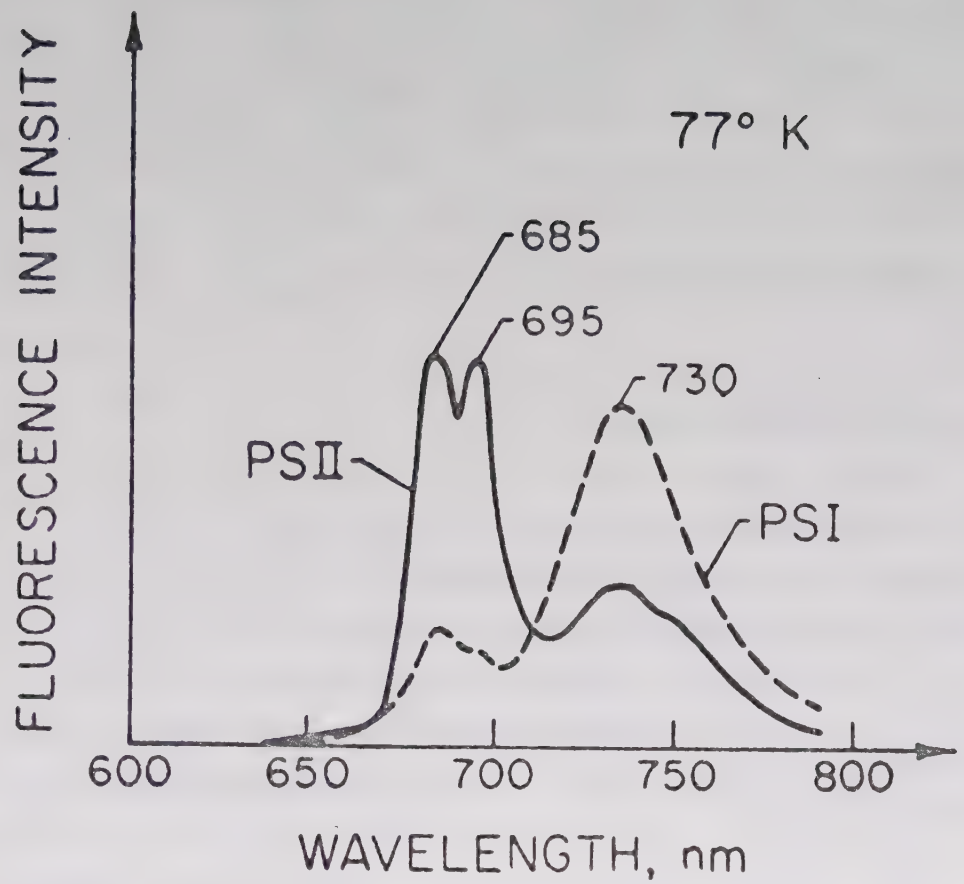


Fig. I. 4 - Emission de fluorescence in vivo à 77°K des pigments des systèmes I et II

(d'après GOVINDJEE 1977)

Une phase rapide est liée à l'échange d'énergie entre les systèmes I et II, une phase lente est liée à une modification de la conformation de la membrane thylakoïde (MOHANTY et GOVINDJEE 1974)

Le rendement de fluorescence est toujours très faible (5 %), la plus grande partie de l'énergie captée étant utilisée dans la chaîne réactionnelle. Ce rendement peut être augmentée si la chaîne est bloqué ("poison") ou au contraire diminué si certaines réactions sont favorisées (réaction de Hill). L'étude du rendement de fluorescence est donc un test du bon fonctionnement du système.

II.3. Etats triplets

Aucune preuve n'a été fournie du rôle effectif de l'état triplet de la chlorophylle dans la photosynthèse. L'état triplet a été trouvé in vivo, mais en proportions très faibles. Sa désactivation peut donner lieu à plusieurs émissions :fluorescence différée, phosphorescence. Mais aucune preuve n'a été fournie qu'il peut céder son énergie à une étape d'une réaction photochimique. Par contre, des radicaux paramagnétiques peuvent se former à partir du dimère spécial. Leur évolution conduit à des espèces de longue durée dont l'étude peut être faite par R.P.E.

III. Propriétés spectroscopiques des pigments in vitro

La complexité des phénomènes in vivo rend nécessaire la constitution et l'étude de modèles réalisés in vitro. Ces modèles peuvent être étudiés sous différents aspects. Par la nature même des phénomènes in vivo, les propriétés spectroscopiques (absorption, fluorescence, états triplets ...) sont les plus utilisées et les plus fécondes.

III.1. Généralités

Les propriétés optiques d'une molécule, qu'elle soit isolée ou insérée dans un environnement plus complexe, résultent d'une part de l'interaction de l'onde électromagnétique avec le réseau électronique de la molécule, d'autre part du réarrangement de la molécule après l'excitation. La première partie conduit aux études de l'absorption de la lumière sous ses différents aspects (absorption moléculaire, dichroïsme), la seconde constitue l'étude des

états excités (fluorescence, phosphorescence, états triplets).

Les états électroniques (fondamental ou excités) d'une molécule sont de deux sortes : les états singulets, de spin global nul, et les états triplets, de spin égal à un. A partir d'un état fondamental singulet S_o (la majorité des cas) on distingue les états excités :

- singulets : la transition électronique n'affecte pas le spin de l'électron
- triplets : la transition se fait avec changement de spin, le spin total devient donc 1.

Les transitions entre deux niveaux étant beaucoup plus probables quand la parité est la même, les deux systèmes d'états électroniques sont relativement indépendants.

- transitions entre les niveaux (Fig. I.5.).

Le passage d'un premier état à un état plus énergétique nécessite un apport d'énergie extérieure ; la plus utilisé est le quantum d'énergie lumineuse $h\nu$: c'est le phénomène d'absorption. Le passage inverse libère l'énergie sous diverses formes : c'est la désactivation.

L'absorption, à partir de l'état fondamental, conduit à des niveaux excités de même parité, donc le plus souvent à des niveaux singulets S_1 S_2... le retour se fait soit par émission de lumière : fluorescence, soit par désactivation non radiative. A partir d'un niveau excité élevé, le retour au fondamental peut se faire en plusieurs étapes.

Le passage d'un état excité S à un état triplet T (croisement intersystème) a lieu malgré sa faible probabilité, en particulier quand la différence d'énergie TS est faible. A partir de là plusieurs voies sont possibles

- absorption conduisant à un état triplet supérieur
- désactivation non radiative
- passage à l'état S_o par émission de lumière : phosphorescence
- passage à l'état S voisin, par exemple sous l'effet de l'agitation thermique. Le retour radiatif à l'état S_o est donc une fluorescence du point de vue énergétique, donc spectral, mais de durée de vie plus longue puisqu'elle a mis en jeu deux transitions S T peu probables (fluorescence différée).

Moments de transition

Au niveau de la molécule, l'interaction entre le champ électromagnétique et le système électronique possède un caractère tensoriel. Pour cela on intro-

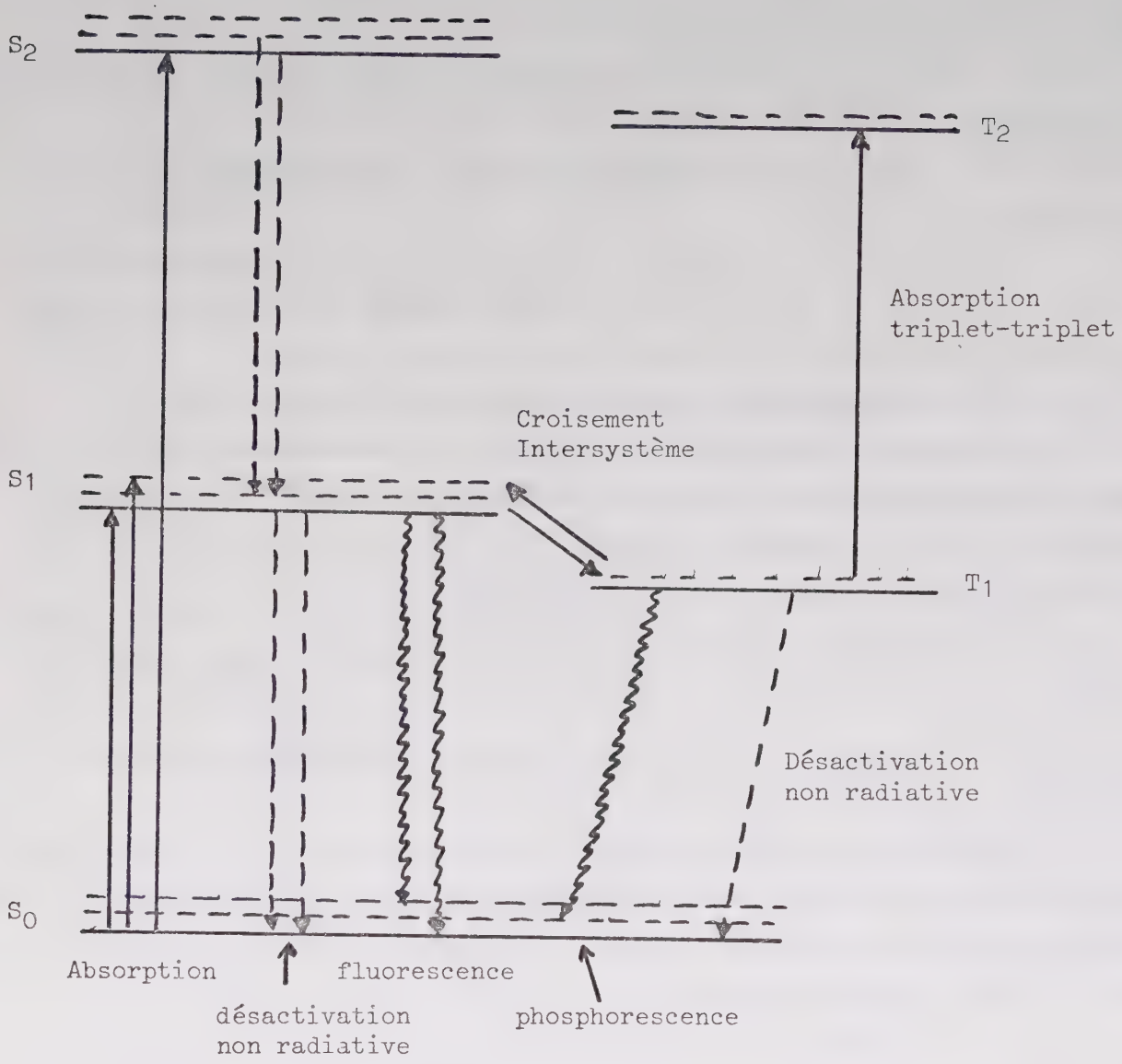


Fig. I. 5 - Niveaux d'énergie et transitions pour une molécule polyatomique

duit un vecteur $\vec{M}$ lié à la molécule en fonction de la distribution des charges avant et après l'excitation. L'interaction avec le champ électrique $\vec{E}$ fait intervenir la composante de $\vec{M}$ sur $\vec{E}$. De la même façon l'onde émise par fluorescence ou phosphorescence est constitué par un champ $\vec{E}$ parallèle à M. Si le milieu contient des molécules réparties au hasard, le caractère vectoriel disparaît. Mais en cas d'orientation partielle ou totale, les phénomènes d'absorption ou de fluorescence font intervenir l'état de polarisation de l'onde absorbée ou émise.

III.2. Propriétés des chlorophylles in vitro

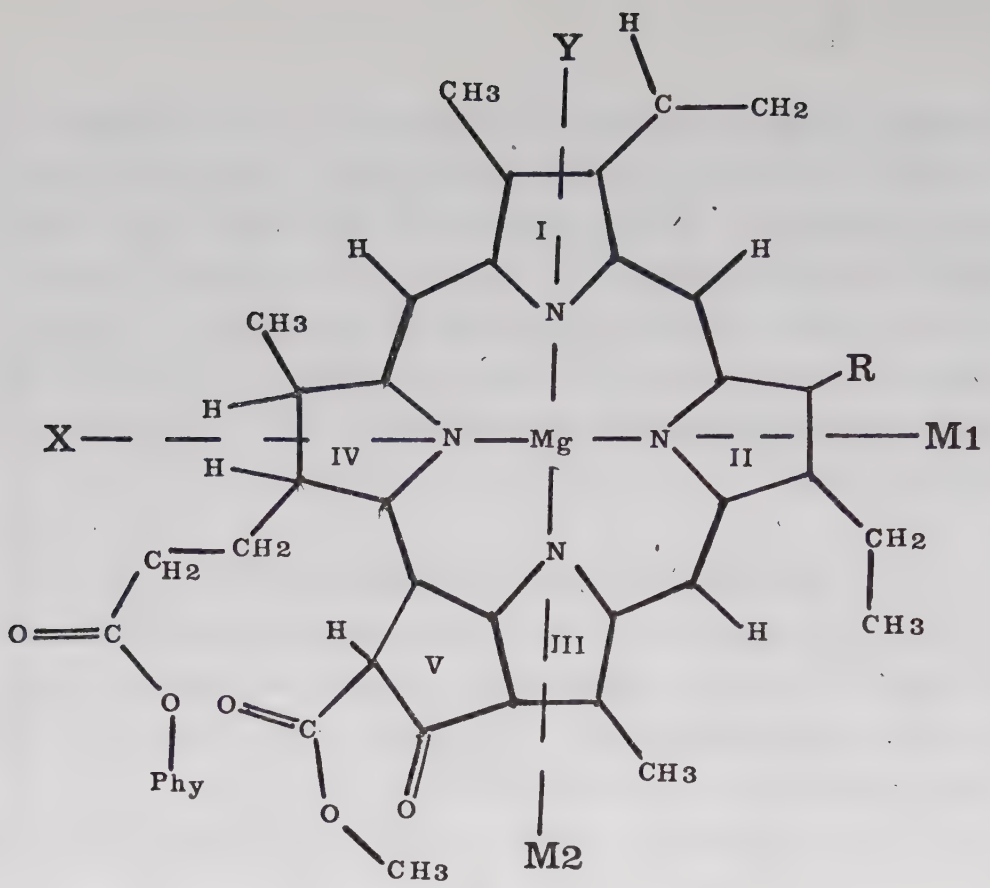
Les chlorophylles a et b et leurs dérivés ont une structure dont la base est constituée par le noyau tétrapyrollique des porphines, avec réduction d'un cycle (dihydroporphine ou chlorine). Trois sortes de modifications sont à noter par rapport à ce noyau de base (Fig. I.6.) :

- présence d'un atome de magnésium lié aux quatre atomes d'azote
- présence d'un cycle pentanone (V)
- présence de substituants variés sur les différents carbones périphériques.

Un de ces constituants importants est constitué par le radical phytol attaché au cycle réduit IV.

Depuis les premiers travaux de SIMPSON (SIMPSON 1949) on admet que, dans le domaine visible, les propriétés spectroscopiques des porphines et de leurs dérivés sont dues essentiellement à l'ensemble des électrons π délocalisées au niveau du cycle tétrapyrollique. Divers travaux théoriques (LONGUET-HIGGINS et al. 1950 ; GOUTERMAN 1961 ; GOUTERMAN et al. 1962, 1963 ; WEISS et al. 1965) ont permis de montrer que ces propriétés sont décrites par l'existence de 4 orbitales moléculaires de type π. Le passage porphine - chlorophylle se traduit essentiellement par la perte de la symétrie D4h avec la réduction du cycle IV, conduisant à la levée de dégénérescence de certains niveaux et à la modification des probabilités de transition. Les modifications supplémentaires (Mg central, substitutions, cycle pentanone) n'apportent que des perturbations secondaires : déplacement des bandes, modification de leur intensité.

La théorie permet également de préciser que les différentes transitions correspondent à deux moments de transition M_1 et M_2. Le moment M_1 est porté par l'axe X situé dans le plan du noyau pyrollique et passant par les cy-

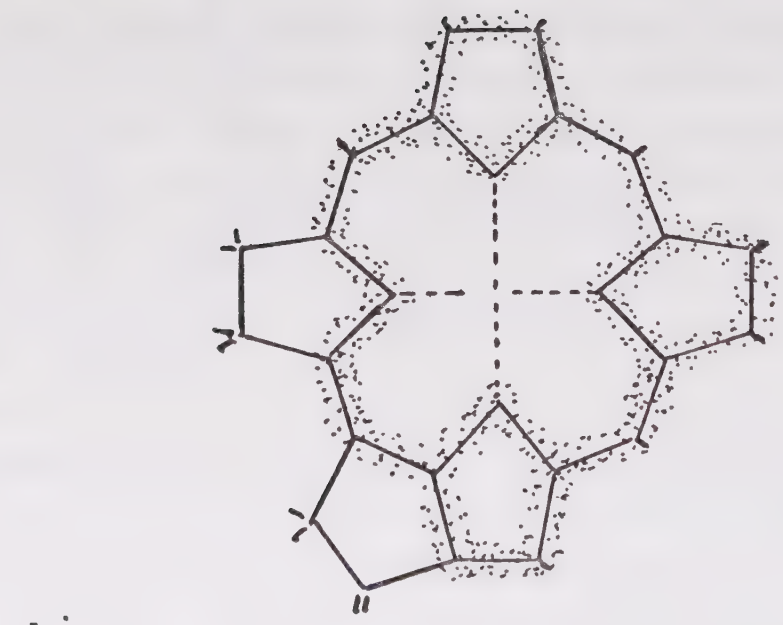


Chla : R = CH_3

Chlb : R = CHO

Pha = Chla - Mg

Mpha = Pha - Phy



Extension de la liaison délocalisée des électrons II

Fig. I. 6 - Formules des chlorophylles et dérivés

cles II et IV ; le moment M_2 est porté par l'axe Y joignant les cycles I et III. M_1 et M_2 sont donc dans le plan de la molécule et sensiblement orthogonaux. (Fig. I.6 et I.7.).

Spectre d'absorption

A la lumière des résultats théoriques, il est possible d'interpréter les spectres d'absorption des chlorophylles et de leurs dérivés. D'autres techniques sont nécessaires pour préciser l'interprétation : polarisation de fluorescence (GOUTERMAN, STRYER 1962 ; BAR et al. 1961 ;HOUSIER-SAUER 1969), dichroïsme naturel ou magnétique (HOUSIER-SAUER 1970).

Le spectre d'absorption des chlorophylles et dérivés présente deux bandes principales (Fig. I.8). La bande correspondant au niveau excité de plus basse énergie se situe dans le rouge (600 - 700 nm). Elle est simple et a pu être attribuée au moment M_2. La bande de Soret (région 300 - 500 nm) est plus complexe et fait intervenir les deux moments de transition. Le résultat le plus généralement admis est que la composante de plus basse énergie est due à M_1 et la composante voisine à M_2.

Fluorescence

Elle correspond à la désactivation radiative d'un niveau excité S. La désactivation non radiative l'emporte largement pour les états excités supérieurs à S_1. Pourtant une fluorescence "bleue" a été détectée pour certains dérivés proches de la chlorophylle : tétrabenzoporphine et dérivés métalliques (ZALESSKI et al. 1973) ou de la Chla elle-même (TAMKIVI et AVARMAA 1979).

Dans les solvants polaires usuels, le spectre d'émission de fluorescence est simple et présente l'aspect classique de l'image de la bande d'absorption (Fig. I.9). A une bande importante vers 680 nm s'ajoute un épaulement vers 720 nm (pour Chla) qui a été parfois attribué à une forme dimérisée du pigment (KAWABE et al. 1970 ; BROYDE et BRODY 1967). Une étude récente l'attribue à un simple niveau vibrationnel (MAU 1976).

Etat triplet

Le peuplement de l'état triplet se fait à partir de l'état singulet voisin. Parce que ce processus est partiellement interdit, il conduit à des rendements quantiques faibles et nécessite des conditions expérimentales particulières.

La phosphorescence des chlorophylles est connue de façon encore imparfaite. Les premiers résultats semblent ceux de CALVIN et DOROUGH (1948) sur la chlorophylle b. Une émission en milieu apolaire a été détectée et attri-

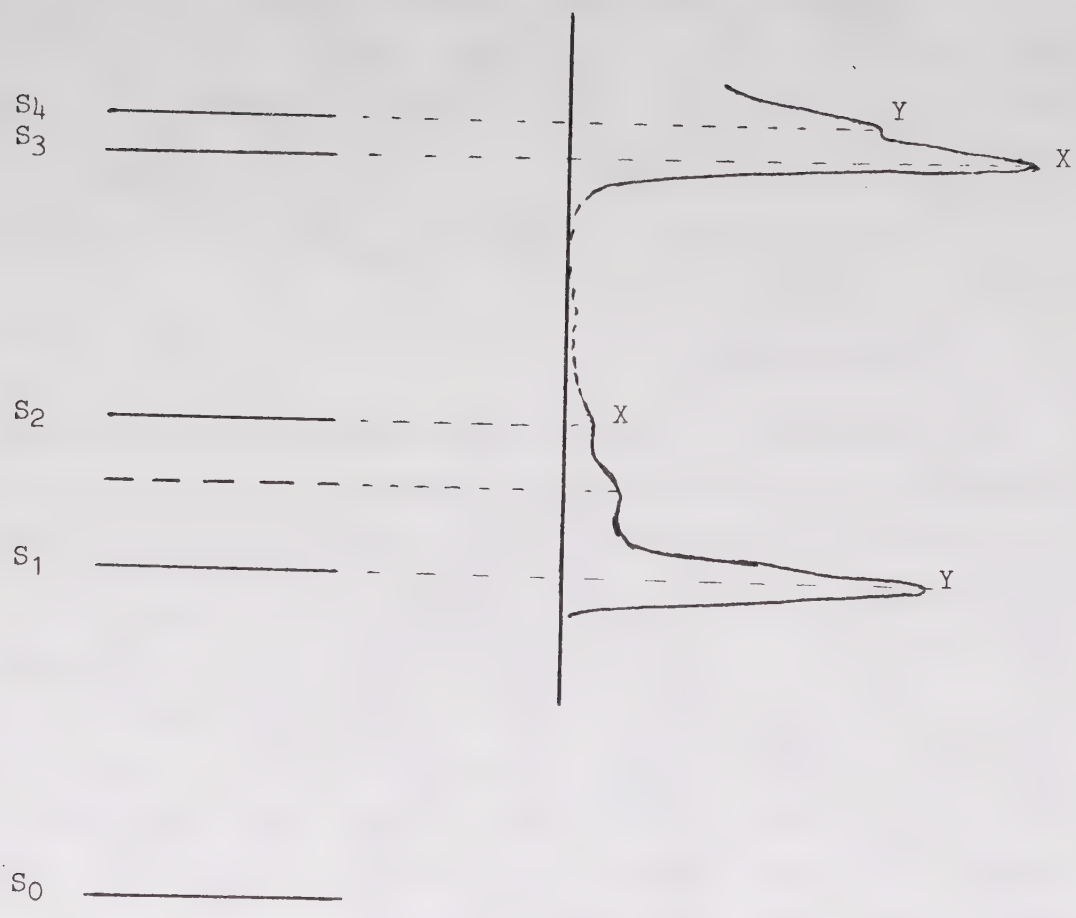


Fig. I. 7 - Niveaux d'énergie et spectres d'absorption
des chlorophylles a et b

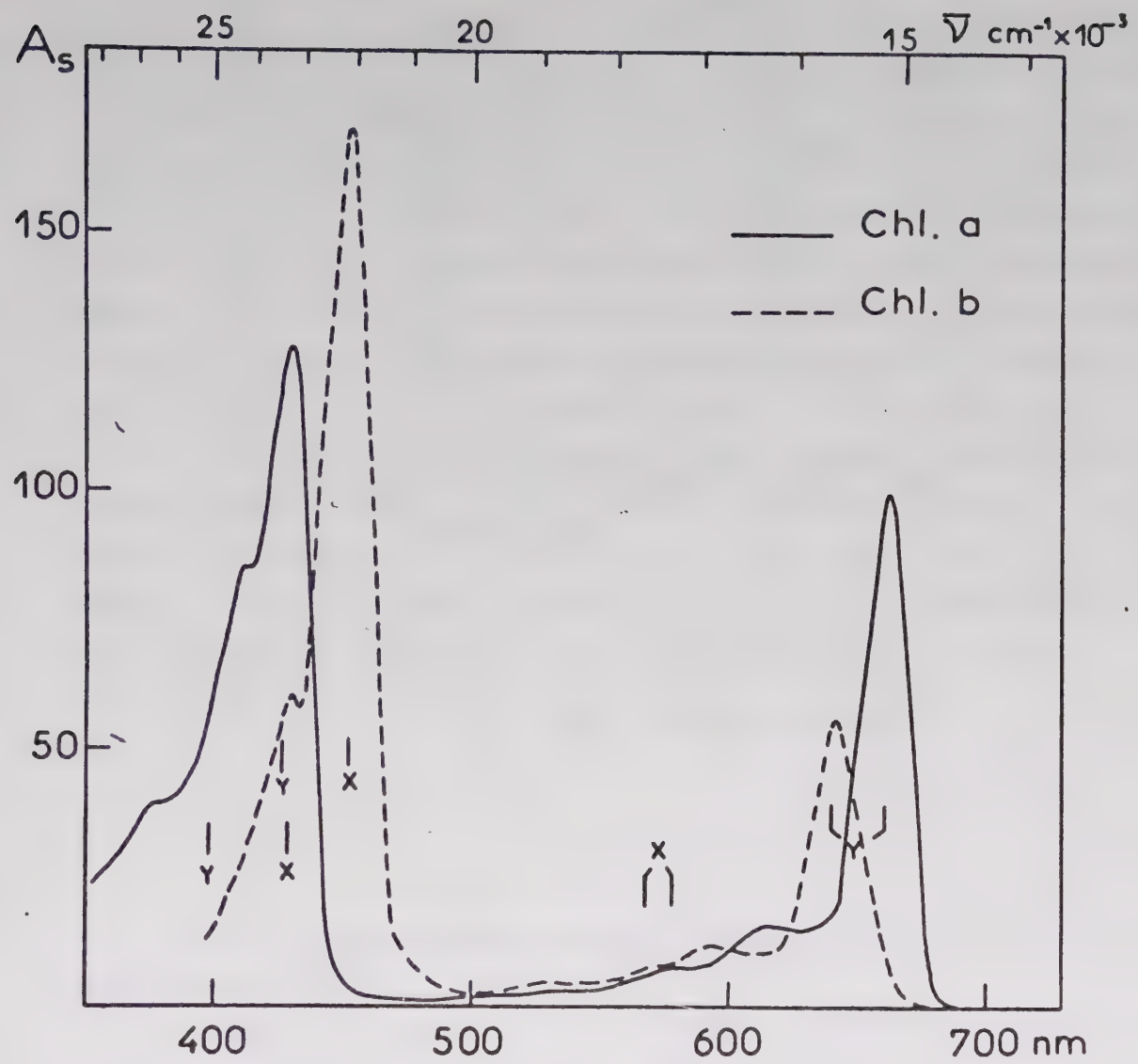
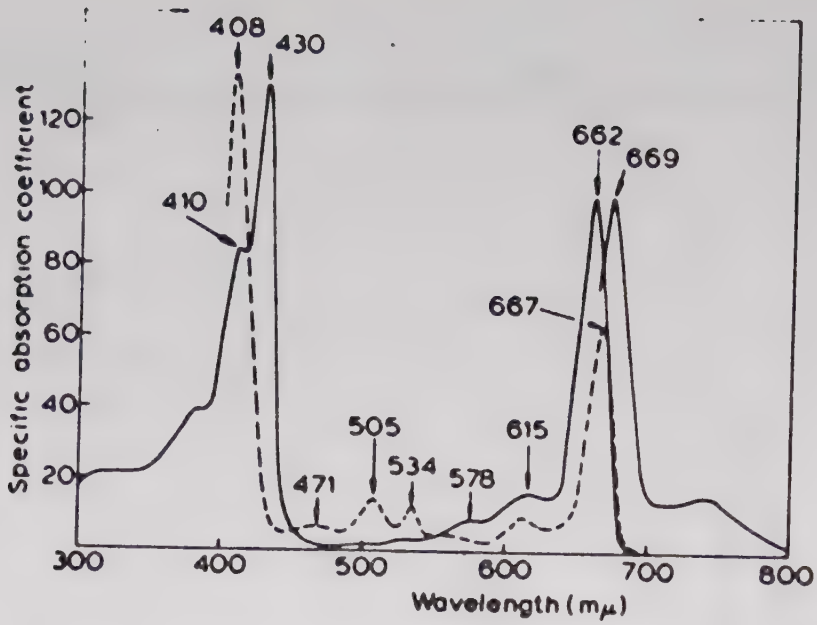
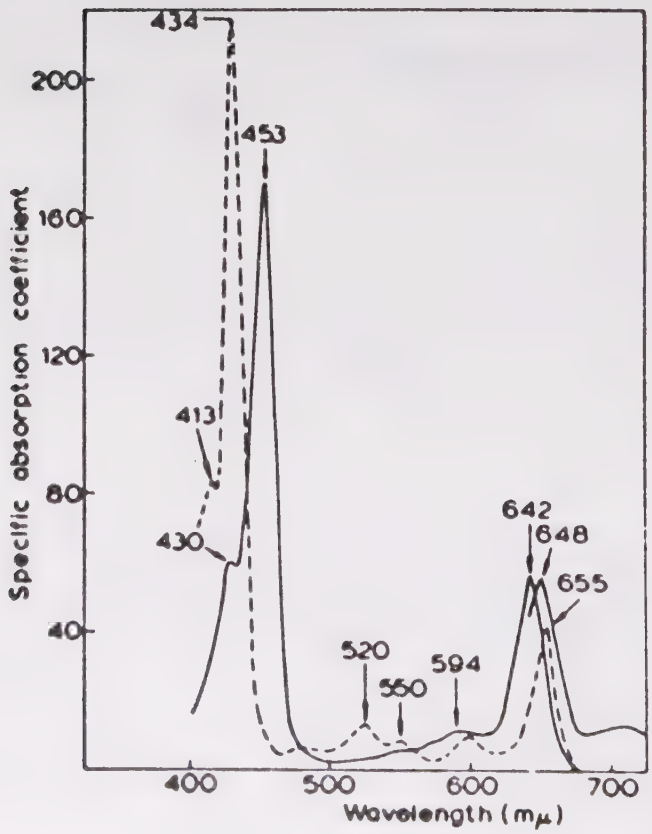


Fig. I. 8 - Spectres d'absorption des chlorophylles a et b dans l'éther et caractérisation des bandes principales (d'après LHOSTE 1968)



Chl a

Fig. I.9. Spectres d'absorption des chlorophylles a et b et spectres d'émission de fluorescence (en pointillé, spectres d'absorption de la phéophytine correspondante) (D'après GOEDHEER 1966)



Chl b

buée à un niveau $n\pi^*$ (FERNANDEZ et BECKER 1959). Plusieurs émissions de phosphorescence ont été notées (AMSTER 1969 ; SING et BECKER 1960 ; KRASNOVSKII et al. 1973 - 1974) se recouvrent mal en particulier à cause des difficultés expérimentales (domaine de longueur d'onde, faible émission, impuretés). Les résultats les plus récents font état d'une émission pour les chlorophylles a et b et de nombreuses dérivés , recouvrant qualitativement les travaux de KRASNOVSKII. Des précisions sont données sur l'importance de l'état du pigment (MAU et PUZA 1977) ou sur la polarisation de la phosphorescence (DVORNIKOV et al. 1978 - 1979).

Le premier niveau triplet peut être également étudié par son spectre d'absorption T_1T_2. Pour cela, le niveau T_1 est peuplé à peu près complètement par un flash intense, et l'absorption est suivie après le flash grâce à un faisceau lumineux continu. L'évolution de cette absorption renseigne sur la désactivation de T_1 qui peut se faire selon plusieurs mécanismes.

$$T_1 \rightarrow S_o$$
$$T_1 + S \rightarrow 2S_o$$
$$T_1 + T_1 \rightarrow T_1 + S_o$$
$$T_1 + T_1 \rightarrow 2S_o$$
$$T_1 + Q \rightarrow S_o + Q^*$$

Q étant une molécule capable d'accepter l'énergie du triplet T_1 (solvant, impureté ...).

Plusieurs études ont permis de déterminer les différentes constantes de désactivation (LIVINGSTON et al. 1954 ; LINCHITZ et SARKANEN 1958 ; CHIBISOV et al 1963, 1965).

Les états triplets ont également été mis en évidence par résonance paramagnétique (RPE). Les premières études ont porté sur la chlorophylle b (RIKHIREVA et al. 1964 ; LHOSTE 1968). Une étude complète a été réalisée par NORRIS et al. (1975). En particulier, il apparaît que les caractéristiques de l'état triplet extrapolées à champ nul dépendent de la nature de l'organisation de la molécule dans le milieu (monomère, dimère, oligomère) (NORRIS et al. 1975 ; HAGELE et al. 1978). Une étude similaire a été faite pour les phéophytines (KLEIBEUKER et al. 1978).

IV. Directions d'étude

L'ensemble des études in vivo permet de mieux connaître le comportement et l'organisation de la chlorophylle au niveau de l'appareil photosynthétique. Deux caractéristiques sont en particulier importantes :

- la chlorophylle n'est pas dispersée mais la forme la plus active est rassemblée et organisée dans un centre de quelques centaines de molécules, avec un noyau actif absorbant vers 700 nm (P700). La grande concentration en pigment, la présence d'autres substances (protéines, lipides, cytochromes, quinones ...) placent la chlorophylle dans des conditions d'interactions importantes : - interaction pigment - pigment
  - interaction pigment - autre substance.

- les molécules de chlorophylle ne sont pas dispersées au hasard dans la membrane du chloroplaste. Malgré les conclusions peu nettes des premières études par polarisation de fluorescence (OLSON et al. 1961 - 1962) il semble admi maintenant que l'orientation des molécules de pigment n'est pas quelconque. En étudiant des chloroplastes orientés par dichroïsme linéaire (BRETON-ROUX 1971, PAILLOTINI - BRETON 1977) ou par polarisation de la fluorescence émise (GEACINTOV et al. 1974) il a été montré que les moments de transition correspondant à l'absorption aux grandes longueurs d'onde de la chlorophylle a étaient orientés parallèlement à la membrane alors que pour la chlorophylle b, l'angle correspondant était d'environ 50°

Agrégation avec liaison à un support protéique et orientation sont donc deux caractéristiques essentielles de la chlorophylle in vivo. La recherche des modèles in vitro est guidée par ces deux propriétés. Parmi ces modèles, trois ont été retenus :

★ étude en milieu aqueux (mélange solvant polaire - eau)

Ce milieu est intéressant car l'eau est présente dans l'apparei photosynthétique. Il met en évidence la formation d'agrégats et de micelles.

★ étude en milieu apolaire. Il permet de mettre en évidence des propriétés spectroscopiques nouvelles, en particulier, la formation d'un dimère no fluorescent mais présentant un état triplet.

★ étude dans les cristaux liquides. C'est une méthode récente et eff cace d'orientation de la chlorophylle qui permet de plus des interprétations quantitatives, en particulier sur les moments de transition de la molécule.

ACKER S., DURANTON J.
Biochim. Biophys. Acta 387 (279) 1975

AMSTER R. L.
Photochem. Photobiol 9 (331) 1969

BAR F., LANG H., SCHNABEL E., KUHN H.
Z. Elecktrochem. 65 (346) 1961

BRETON J., ROUX E.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 45 (557) 1971

BROWN J. S., FRENCH C. S.
Plant. Physiol. 34 (305) 1959

BROYDE S. B., BRODY S. S.
J. Chem. Phys. 46 (3334) 1967

BUTLER W. L. HOPKINS D. W.
Photochem. Photobiol. 12 (439) 1970
12 (451) 1970

CALVIN M. DOROUGH J.
J. AM. Chem. Soc. 70 (699) 1948

CEDESTRAND C. N. RABINOVITCH E. GOVINDJEE
Biochim. Biophys. Acta 1 (126) 1966

CHIBISOV A. F., KARYAKIN A. V.
Dok. Alead. Nank S S S R 153 (1114) 1963

CHIBISOV A. K. KARYAKIN A. V.
Optics and spectro. 15 (345) 1963

COTTON T. M., TRIFUNAC A. D., BALLSCHMITER K. KATZ J. J.
Biochm. Biophys. Acta 368 (181) 1974

CRAMER W. A. BUTLER W. L.
Biochim. Biophys. Acta 153 (889) 1968

DVORNIKOV S.S., KNYUKSHTO V. N., SOLOV'EV K. N., TSVIRKO M. P.
J. Lumin. 18 (491) 1979
Opti. Spect. 46.4 (689) 1979

DVORNIKOV S. S., KNYUKSHTO V. N., SEVCHENKO A. N., SOLOV'EV K. N., TSVIRKO M. P.
Dockl. Akak. Nauk. S S S R 240.6 (1457) 1978

EMERSON R., ARNOLD W.,
J. Gen. Physiol. 16 (191) 1932

EMERSON R.
A. Rev. Pl. Physiol. 9 (1) 1958

FERNANDEZ J., BECKER R. S.,
J. Chem. Phys. 31 (467) 1959

FREI Y. F.
Biochim. Biophys. Acta 57 (82) 1962

FRENCH C. C., BROWN J. S.
Plant. Phys. 49 (421) 1972

GEACINTOV N. E., VAN NOSTRAND F., BECKER J. F.
Biochim. Biophys. Acta 347 (443) 1974

GOEDHEER J. C.
Ann. Revi. Plant. Physiol. 23 (87) 1972

GOEDHEER J. C.,
In the Chlorophylls - Ed VERNON - SEELY
Academ. Press. New-York p. 147 1966

GOUTERMAN M.
J. Mol. Spectro. 6 (138) 1961

GOUTERMAN M., STRYER L.
J. Chem. Phys. 37 (2260) 1962

GOUTERMAN M., WAGNIERE G., SNYDER L. C.
J. Mol. Spectr. 11 (108) 1963

GOVINDJEE, GOVINDJEE R.
Jal. Sci. Indust. Res. 36 (662) 1977

GULAYEV B. A., LITVIN F. F.
Biofizica 15 (670) 1970

HAGELE W., SCHMID D., WOLF H. C.
Z. Naturforsch 33 a (83) 1978
Z. Naturforsch 33 a (94) 1978

HOUSIER C., SAUER K.
Biochim. Biophys. Acta 172 (492) 1969

HOUSIER C., SAUER K.
J. Am. Chem. Soc. 92 (779) 1970

KATZ J. J., NORRIS J. R.
Current topics in bioenergetics -
Vol. 5 - Ed. SANADI
Acad. Press. Inc. New-York (41) 1973

KAWABE K.,NAEMURA M., MATSUKAWA Y.
Techn. Rept. Osaka. Univ. 20 (665) 1970

KLEIBEUKER J. F., PLATENKAMP R. J., SCHAAFSMA T. J.
Chem. Phys. 27 (51) 1978

KRASNOVSKII A. A., ROMANYUK V. A., LITVIN F. F.
Dok. Akad. Nauk S S S R 209 (51) 1973

KRASNOVKII A. A., LEBEDEV N. N., LITVIN F. F.
Dok. Akad. Nauk S S S R 216 (1406) 1974

LHOSTE J. M.
C. R. Acad. Sci. 266 D (1059) 1968

LHOSTE J. M.
Stud. Biophysica 12 (135) 1968

LHOSTE J. M.
Bull. Soc. Phys. Végét. 14 (379) 1968

LINCHITZ H., SARKANEN K.
J. Am. Chem. Soc. 80 (4826) 1958

LIVINGSTON R., PORTER G., WINDSOR M.
Nature 173 (485) 1954

LONGUET-HIGGINS H. C., RECTOR C. W., PLATT J. R.
J. Chem. Phys. 18 (1174) 1950

MAU A. W. H.,
Chem . Phys. Lett. 38 (279) 1976

MAU A. W. H., PUZA
Photochem. Photobiol. 25 (601) 1977

MOHANTY P. GOVINDJEE
Pl. Biochemical J. 1 (78) 1974

NORRIS J. R., UPHAUS R. A., KATZ J. J.
Chem. Phys. Letters 31 (157) 1975

OLSON R. A., BUTLER W. L., JENNINGS
Biochim. Biophys. Acta 54 (615) 1961
Biochim. Biophys. Acta 58 (144) 1962

PAILLOTIN G., BRETON J.
Biophys. Jal. 18 (63) 1977

PAPAGEORGIOU G.
Bioenergetics of Photosynthesis
Ed. GOVINDJEE p. 319 1978

RIKHIREVA G. T., GRIBOVA Z. P., KAIUSHIN L. P., UMRIKHINA A. V., KRASNOVSKII A. A.
Dok. Akad. Nauk S S S R 159 (196) 1964

SIMPSON W. T.
J. Chem. Phys. 17 (1218) 1949

SINGH J. S., BECKER R. S.
J. Chem. Soc. 82 (2082) 1960

TAMKIVI R. P., AVARMAA R. A.
Biofizika 24-3 (540) 1979

WEISS C., KOBAYASKI H., GOUTERMAN M.
J. Mol. Spectr. 16 (415) 1965

WITT K. T.
Bioenergetics of photosynthesis éd. GOVINDJEE
(Acad. Press. Inc. New-York) p. 493 1975

Chapître II. Méthodes expérimentales

I. Préparation des produits

I.1. Pigments végétaux

Les pigments utilisés ont été préparés au laboratoire à partir d'épinards frais par une méthode classique (VERNON et SEELY 1966). Les pigments sont alors conservés en solution benzénique (après séchage sur $Na_2 SO_4$) au réfrigérateur. La qualité des produits est testée par spectroscopie d'absorption, en particulier par la détermination du rapport des absorptions spécifiques de la bande rouge et la bande Soret principale.

Les phéophytines sont préparées à partir des chlorophylles correspondantes par action de l'oxalate de sodium. Les solutions ainsi obtenues sont stables pendant plusieurs mois ; leur qualité est contrôlée par spectroscopie d'absorption. On ne met pas évidence, en particulier, de phénomènes d'oxydation tels qu'ils peuvent se produire en présence d'amines (HOCHAPFEL et al 1970) ou de détergent (CHAUVET et al 1974).

II.2. Cristaux liquides et colorants

Nous avons utilisé trois cristaux liquides, nématiques au voisinage de la température ordinaire

la N (p.méthoxy benzylidène - p.n. butylaniline
ou MBBA a été synthétisée au laboratoire.

le p.pentyl-p' cyanobiphenyl ou K 15 a été fourni par B.D.H.

Le mélange eutectique de
4 n pentyl trans trans bicyclohexyl 4' carbonitrite
4 n propyl trans trans bicyclohexyl 4' carbonitrite
4 n heptyl trans trans bicyclohexyl 4' carbonitrite

ou Z L I a été fourni par MERK.

Le colorant orange red (OR) ou p.nitrophenylazo p' N.N. diméthylaniline a été synthétisé au laboratoire.

II. Techniques expérimentales

II.1. Spectres d'absorption

Les spectres d'absorption ont été enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre CARY 14.

Pour l'étude en lumière polarisée, deux prismes de Glann identiques sont placés dans les faisceaux d'étude et de référence. Ils sont montés sur un support tournant permettant de faire varier le plan de polarisation.

II.2. Exploitation des résultats

Les calculs ont été effectués avec un calculateur Hewlett-Packard 9820 et ses périphériques, en particulier le traceur de courbes 9871 A.

II.3. Etats triplets

Les états triplets de la chlorophylle ont été détectés avec un appareil de photolyse éclair construit au laboratoire.

Il comprend (Figure II.1)

- un dispositif d'irradiation constitué par deux lampes au Xénon (longueur 12 cm, tension de claquage 6 KV, énergie maximum 200 Joules). Elles sont placées en série et chargées par un ou deux condensateurs BOSCH de 7,7 μF à faible inductance et une alimentation SORENSEN réglables de 0 à 30 KV. Pour une tension de travail de 4 KV et une énergie d'environ 60 Joules, la durée du flash à mi-hauteur est de 20 μs environ.

- un dispositif d'analyse en lumière continue pour l'étude des variations d'absorption de la substance irradiée.

La lumière est fournie par une lampe alimentée en continu (arc au Xénon XBO 150 OSRAM). Un jeu de lentilles réalise un faisceau de lumière parallèle traversant la cuve à irradiation et focalise le faisceau sur la fente d'entrée du monochromateur d'analyse.

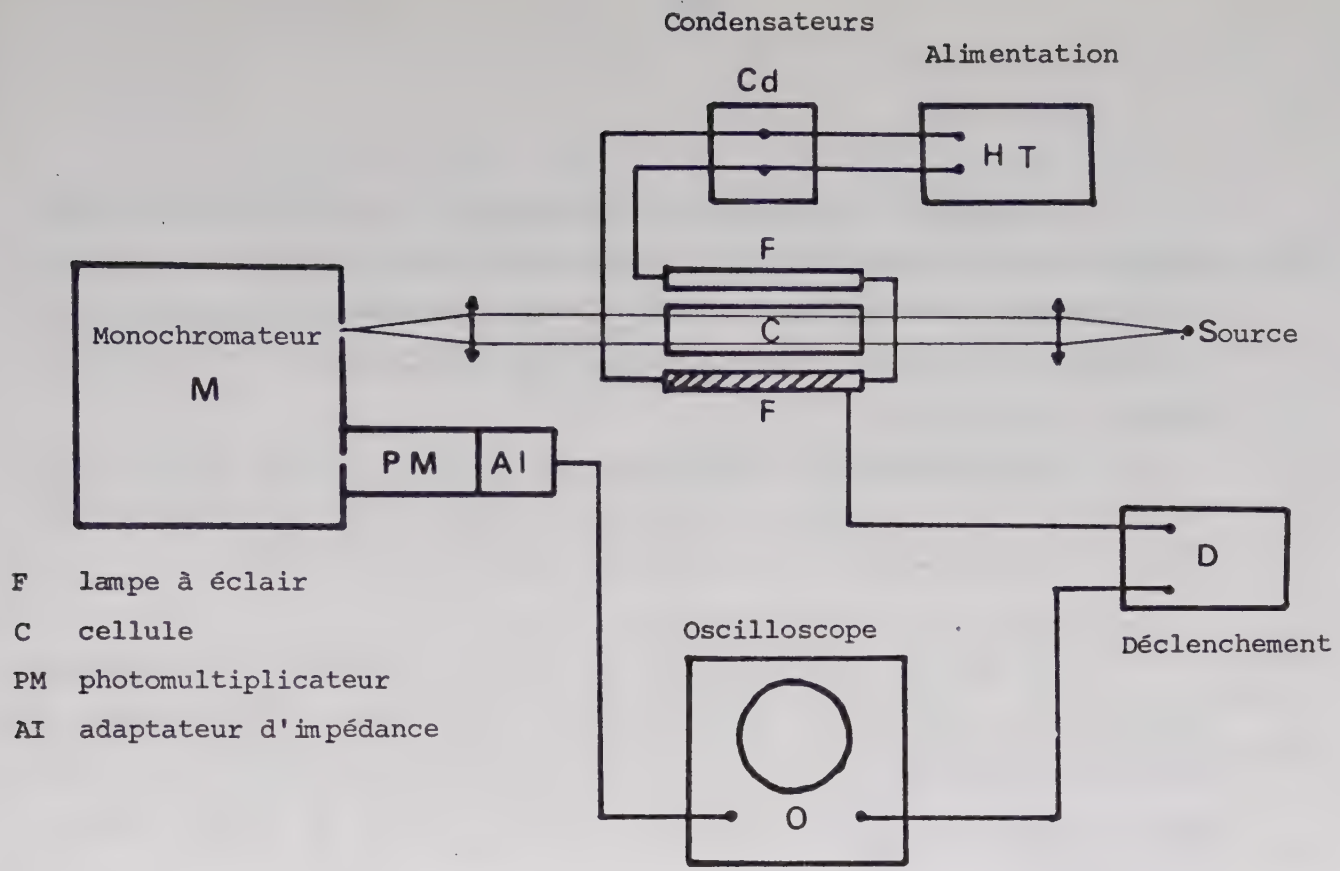


Fig. II.1. Schéma de l'appareil à photolyse éclair.

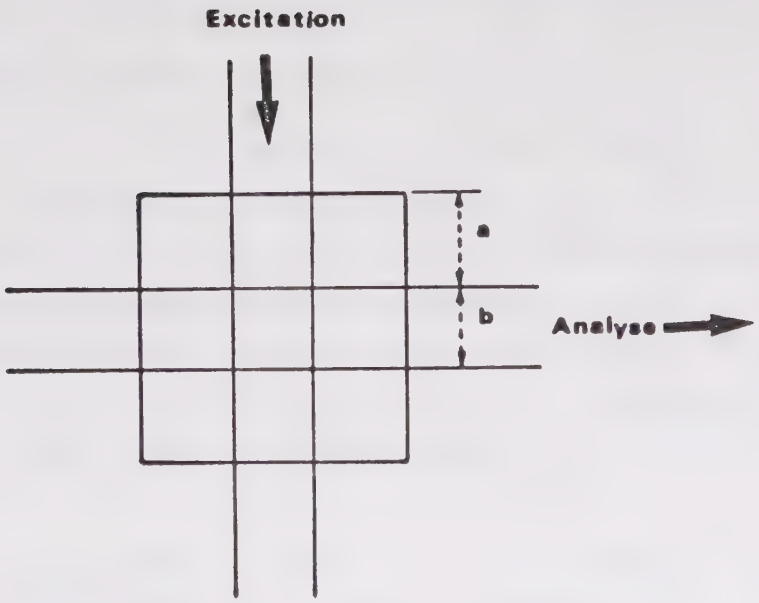


Fig. II.2. Trajets de la lumière dans la cuve à fluorescence.

La cuve à irradiation est cylindrique, avec double corps pour utilisation éventuelle d'un filtre liquide ou d'un fluide thermostatique. Les longueurs utilisées vont de 1 à 10 cm en fonction de la concentration en pigment. La longueur d'onde d'analyse est sélectionnée par un monochromateur à réseau SOPRA.

Les variations d'absorption sont détectées par un photomultiplicateur RCA 1P21. Le courant anodique est enregistré sur un oscilloscope à mémoire TEKTRONIX 564 B à travers un adaptateur d'impédance.

- un dispositif de déclenchement

Il fournit des impulsions qui amorcent la décharge du condensateur dans la lampe éclair. Ces impulsions possèdent un retard réglable sur d'autres impulsions déclenchant le balayage de l'oscilloscope. Ce système permet de connaître l'absorption de la solution avant et après l'éclair d'irradiation.

II.4. Spectres de fluorescence.

Ils ont été enregistrés avec un appareil construit au laboratoire (NORMANDIN et al 1971). Cet appareil répond à deux préoccupations

- être sensible dans la région 600 - 800 nm qui est le domaine de fluorescence des chlorophylles et dérivés ;
- être corrigé pour tenir compte des différentes fonctions d'appareil et permettre ainsi des comparaisons plus sûres entre plusieurs expériences.

II.4.1 Principe des corrections

Soit $\emptyset_{(\nu E)}$ le flux photonique d'excitation à la fréquence ν_E. En observation classique à 90° et avec une cuve de section parallélépipédique, une partie seulement de la solution participe à la fois à l'analyse et à l'excitation (Figure II.2). Le flux absorbé dans le volume utile est alors :

$$\emptyset_{(\nu E)} \; e^{-\epsilon(\nu E).C.a} \; (1 - e^{-\epsilon(\nu E).C.b})$$

C est la concentration de la substance fluorescente
$\epsilon(\nu_E)$ est le coefficient d'absorption molaire de la substance à la fréquence ν_E.

Si $\rho(\nu_E \nu_F)$ est le rendement quantique pour la fréquence d'excitation ν_E et la fréquence d'analyse ν_F le flux photonique émis vaut

$$\phi_1 = \rho(\nu_E \nu_F)\ \phi_{(\nu_E)}\ e^{-\epsilon(\nu_E).C.a}\ (1 - e^{-\epsilon(\nu_E).C.b})$$

le flux reçu par le récepteur photoélectrique est

$$\phi_2 = \phi_1 .\ H\ .\ \tau(\nu_F)$$

H est un facteur géométrique traduisant le fait qu'une partie seulement du flux est capté par le monochromateur d'analyse. Si les aberrations chromatiques sont négligeables, c'est un facteur qui ne dépend que des dimensions des fentes des monochromateurs.

$\tau(\nu_F)$ est le facteur de transmission du monochromateur d'analyse à la fréquence ν_F.

Si la lumière fluorescée est elle-même partiellement réabsorbée, un facteur correctif calculable doit être ajouté

Si le récepteur est un photomultiplicateur débitant dans une résistance R, la tension recueillie aux bornes de R est

$$V(\nu_E \nu_F) = \phi_2\ .\ \tau'_{(\nu F)}\ .\ R.$$

$\tau'(\nu_F)$ est le rendement quantique du photomultiplicateur à la fréquence ν_F.

La réponse globale de l'appareil est donc

$$V_{(\nu_E \nu_F)} = \phi_{(\nu_E)}\ e^{-\epsilon(\nu_E).C.a}\ (1 - e^{-\epsilon(\nu_E).C.b})\ \rho(\nu_E \nu_F)\ H\ .\ R\ .\ T_{(\nu_F)}$$

avec $T_{(\nu_F)} = \tau(\nu_F)\ .\ \tau'(\nu_F)$ caractérisant la réponse globale de l'ensemble monochromateur d'analyse photomultiplicateur.

La quantité recherchée est $\rho_{(\nu_E \nu_F)}$; elle diffère donc de $V_{(\nu_E \nu_F)}$

Le facteur H peut être maintenu constant ou mesuré en valeur relative

Les facteurs dus à l'absorption ou à la réabsorption peuvent être calculés.

Seules les quantités $\phi(\nu_E)$ et $T(\nu_F)$ altèrent la détermination de $\rho(\nu_E \nu_F)$ respectivement pour les spectres d'action (ν_E variable) ou pour les spectres d'émission (ν_F variable)

Les corrections en excitation ou en analyse vont consister à tenir compte de ces deux facteurs.

Correction en excitation

La quantité $\phi_{(\nu E)}$ peut être déterminée à l'aide d'un compteur quantique. La correction peut alors être manuelle ou automatique (WITHOLT, BRAND 1968 ; ROSEN, EDELMAN 1965 ; HAUGEN, MARCUS 1964).

Il est plus facile d'agir sur le flux énergétique $W_{(\nu E)} = \phi_{(\nu E)} \times h\nu_E$ Cette quantité est en effet mesurable par un récepteur énergétique (par exemple thermopile). Un asservissement agissant soit sur l'intensité de la source (STUPP 1962, KRAUZMAN, KARA 1966) soit sur la largeur des fentes du monochromateur (BORRESEN 1965) maintient le flux énergétique constant. La première technique est limitée quand la source n'est pas à incandescence ; la deuxième travaille à largeur spectrale variable.

La méthode que nous avons retenue consiste à agir sur le flux arrivant au niveau de la cellule avec un dégradé angulaire d'absorption variable.

Dans ces conditions, la réponse de l'appareil est :

$$V = K \cdot \phi_{(\nu E)} \rho_{(\nu E \nu F)} = K \; W_{(\nu E)} \; \rho_{(\nu E \nu F)} \times \frac{1}{h\nu_E}$$

$W_{(\nu E)}$ étant maintenu constant, nous obtenons

$$\rho(\nu_E \nu_F) = A \, V \times \nu_E$$

Correction en analyse

Il s'agit de compenser la fonction de transmission de l'ensemble monochromateur d'analyse - photomultiplicateur - $T(\nu_F)$. Pour une excitation donnée, la tension mesurée est de la forme

$$V = k \, R \; \rho_{(\nu E \nu F)} \; T_{(\nu F)}$$

Elle peut être rendue proportionnelle à $\rho(\nu_E \nu_F)$ si R est variable et de la forme $R = R(\nu_F) = \frac{B}{T(\nu_F)}$

Ceci peut être réalisé par un système de potentiomètres (HOWERTON 1967) Ici, nous avons réalisé une correction continue en asservissant la résistance R au défilement de la longueur d'onde d'analyse.

II.4.2. Réalisation expérimentale

a) schéma du fluorimètre (Figure II.3).

La lumière excitatrice est fournie par un ensemble comprenant :

- une source lumineuse (lampe quartz iode Sylvania FAD 650 W, température de couleur 3 400° K, ou lampe à Xénon XBF OSRAM).

Les deux lampes sont alimentées en continu.

- un monochromateur à réseau du type Hebert Fastié, focale 480 nm, équipé d'un réseau Bausch et Lomb de 52 x 52 nm, comportant 600 traits par nm et blazé à 5 000 Å.

La lumière de fluorescence est analysée par un ensemble comprenant :

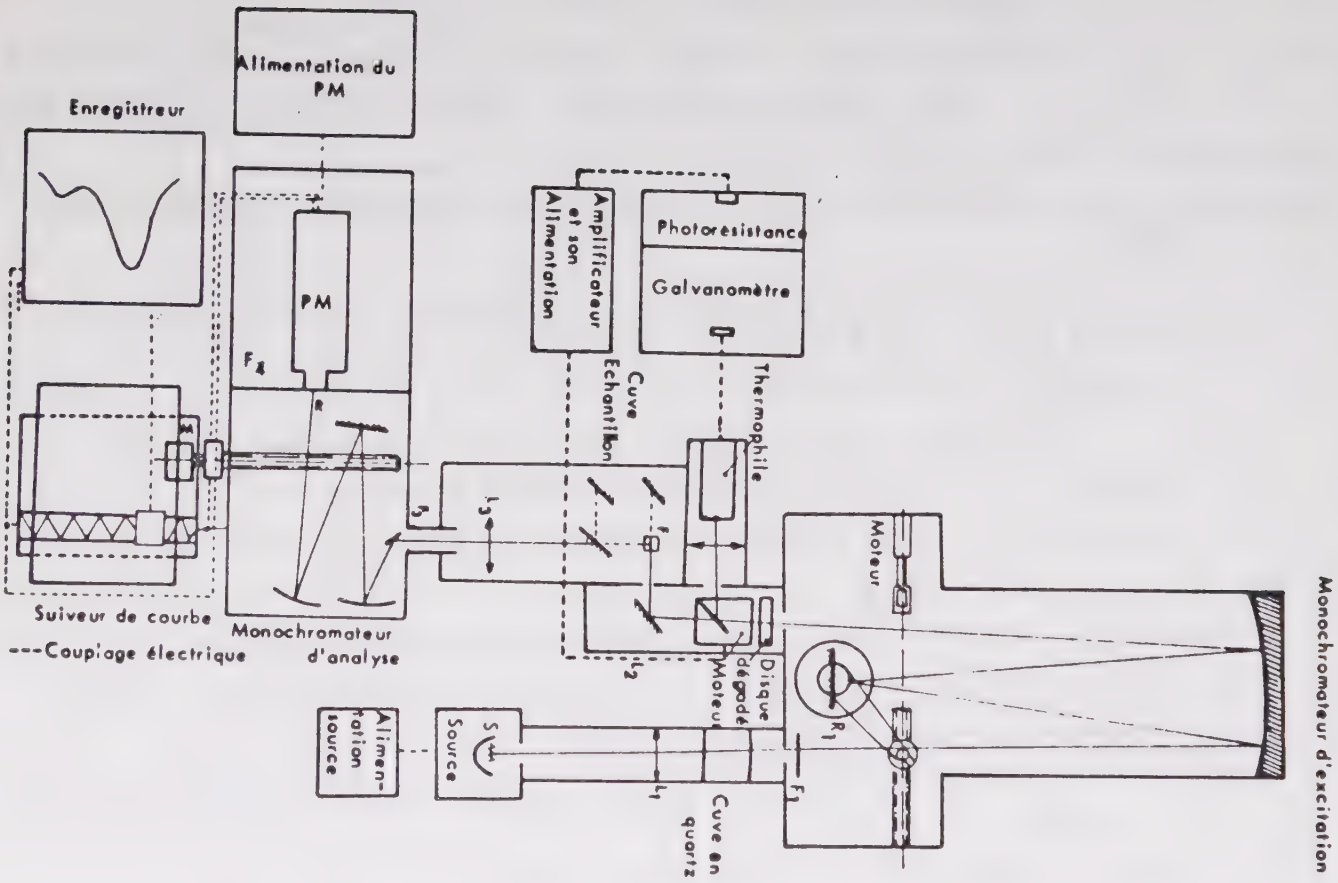
- un monochromateur type Barr et Stroud, en montage Czerny Turner, dont la première moitié seulement a été utilisée. Il est équipé d'un réseau Jobin Yvon de 56 x 56 mm, comportant 1 200 traits par mm et blazé à 5 000 Å.

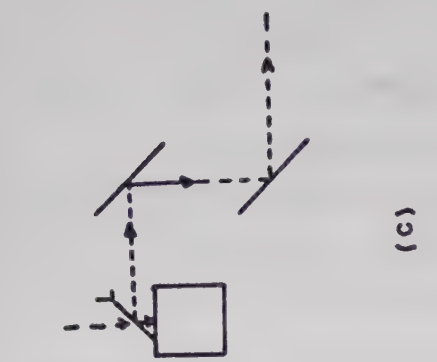
- un photomultiplicateur EMI 9558 B ayant une réponse spectrale du type S 20. Le courant du photomultiplicateur est enregistré par l'intermédiaire de la tension apparaissant aux bornes d'une résistance de charge.

Les longueurs d'onde d'analyse et d'excitation d'une part, le papier de l'enregistreur d'autre part, sont entraînés linéairement en fonction du temps par des moteurs synchrones ; les enregistrements sont donc directement gradués en longueur d'onde.

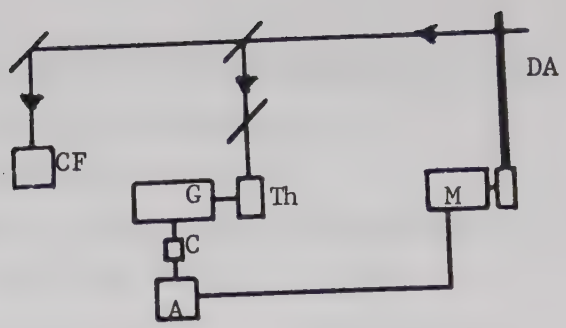
Le compartiment cuve a été étudié de façon à permettre une grande variété d'utilisation (Fig. II.4). Son centre est conjugué à la fois de la fente de sortie du monochromateur d'excitation et de la fente d'entrée du monochromateur d'analyse par deux condenseurs en quartz. Un jeu de miroirs permet l'observation classique à 90°, par transmission, par réflexion oblique ou normale avec des cuves à fluorescence carrées (10 x 10 mm). Le dernier mode a été aussi utilisé pour des solutions très absorbantes avec une

Fig. II.3. Schéma général du spectrofluorimètre.



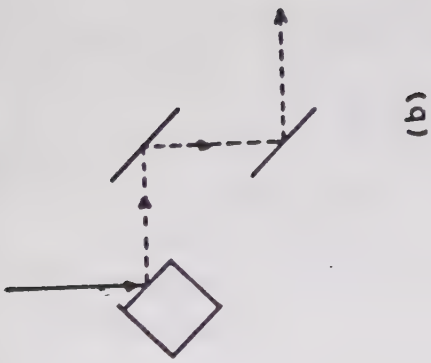


(c)

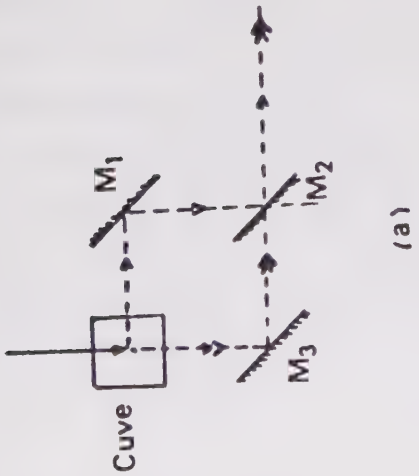


Fig; II . 5 . Controle du flux énergétique .

DA: dégradé angulaire
CF: cuve à fluorescence
Th: thermopile
G: galvanomètre
C: cellule photorésistante
A: amplificateur d'asservissement
M: moteur d'entrainement de DA



(b)



(a)

Fig II . 4 Agencement du compartiment cuve .
a)observation à 90 ° ou par transmission
b)observation par réflexion oblique
c)observation par réflexion normale

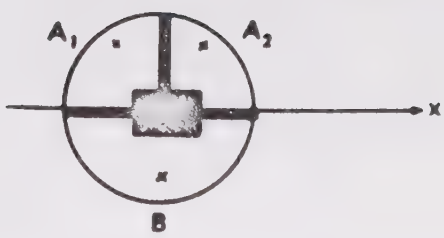


Fig II . 6 . Cellule photo-résistante .

R_{p1} :résistance entre A_1 et B

R_{p2} :résistance entre A2 et B

cuve à épaisseur variable (accessoire Bayonne de Jobin Yvon).

b) correction d'excitation

Elle consiste à contrôler le flux énergétique arrivant sur la cuve à fluorescence par un système d'asservissement (Fig. II.5).

L'organe de contrôle est constitué par un disque dégradé angulaire placé à la sortie du monochromateur d'excitation, il peut être entraîné par un moteur à double sens de rotation ; on obtient ainsi une absorption variable.

L'organe de commande est constitué par une thermopile recevant une fraction constante du flux arrivant sur la cuve à fluorescence. Cette division est réalisée grâce à trois lames semi-transparentes identiques ; les deux faisceaux utilisés ont donc des énergies égales quelles que soient les variations des propriétés des lames.

Le courant de la thermopile est détecté grâce à un galvanomètre dont le spot est focalisé sur une cellule photorésistante différentielle utilisée dans certains suiveurs de spots (Fig. II.6). Elle est constituée par deux résistances Rp_1 et Rp_2 variables avec l'éclairement qu'elles reçoivent. Ces deux résistances sont placées dans un pont de Wheatstone dont la tension de déséquilibre commande, par l'intermédiaire d'un amplificateur d'asservissement classique, le moteur couplé au disque dégradé. Le sens de rotation du moteur dépend du sens du déséquilibre du pont, donc de la variation du rapport Rp_1/Rp_2, donc de la place du spot sur la cellule.

La cellule photorésistante étant fixe, toute variation du flux lumineux sortant du monochromateur d'excitation va provoquer un déplacement du spot du galvanomètre, donc va faire varier le rapport Rp_1/Rp_2 ; cela va entraîner la rotation du disque dégradé dans un sens tel que la variation d'absorption compense la variation initiale du flux. Le réducteur de vitesse adapté au moteur a été choisi de façon à obtenir une réponse suffisamment rapide, tout en évitant les oscillations. Il faut également éviter les variations trop rapides de flux ; en effet, si le spot quitte la cellule photorésistante, la stabilisation n'existe plus.

c) correction d'analyse

Elle doit tenir compte du pouvoir de transmission $T(\nu_F)$ de l'ensemble d'analyse de la lumière de fluorescence.

Détermination de la fonction $T(\nu_F)$

Nous utilisons comme source la lumière arrivant sur le compartiment cuve et possédant une énergie constante quelle que soit la longueur d'onde. Toute cette lumière est envoyée par un miroir dans l'ensemble d'analyse et nous enregistrons, par balayage de la longueur d'onde λ_F, une courbe dont l'aire est proportionnelle à $T(\nu_F)$.

Principe de la correction

Soit R la résistance de charge du P.M. La réponse de l'ensemble d'analyse sera : $\rho(\nu_F) = R.T(\nu_F).\ \Phi_F(\nu_F)$. Pour que

$$\rho(\nu_F) = K.\Phi_F(\nu_F)$$

K étant une constante, il faut prendre pour R une fonction de ν_F (ou de λF), telle que $R(\nu_F).T(\nu_F) = K$.

Réalisation pratique (Fig. II.7.).

Il faut réaliser une résistance variable de la forme $R(\nu_F) = \frac{K}{T(\nu_F)}$; ceci pourrait être conçu avec une série de potentiomètres, mais nous avons préféré une solution donnant à $R(\nu_F)$ une variation continue. La résistance variable peut être considérée comme un rhéostat dont le point de contact variable C serait lié à un dispositif suiveur de courbes ; on a alors $R = BC$. Si $BC = \frac{K}{T(\nu_F)}$ R aura bien une valeur correcte.

La courbe $BC = \frac{K}{T(\nu_F)}$ est tracée sur un rouleur de papier entraîné par le même moteur que le balayage en longueur d'onde du monochromateur d'analyse, le point C étant solidaire de la cellule du suiveur de courbe. Pour tracer cette courbe on donne à BC la valeur maximum BA pour la longueur d'onde λ_{F_1} qui correspond au minimum de la fonction $T(\lambda_F)$ dans le domaine choisi. Pour toute autre longueur d'onde λ_F, on donne à BC la valeur

$$BC = BA\ .\ \frac{T(\lambda_{F_1})}{T(\lambda_F)}\ .$$

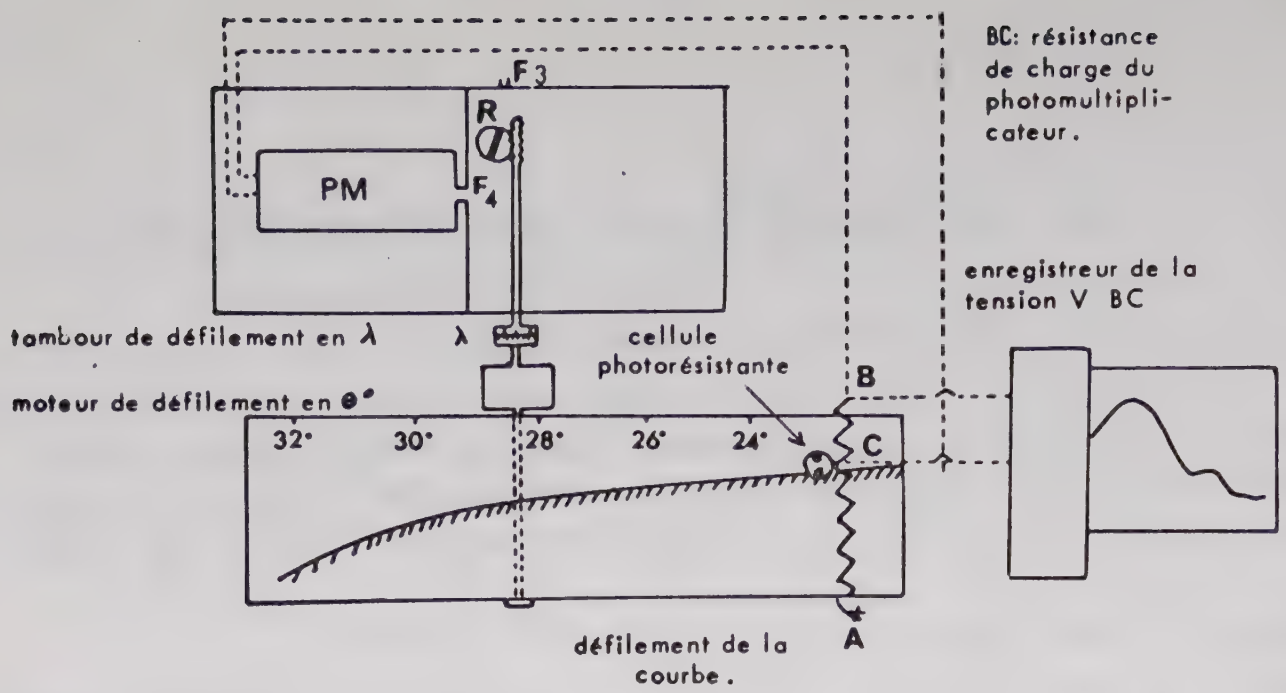


Fig. II.7. Dispositif de correction en analyse.

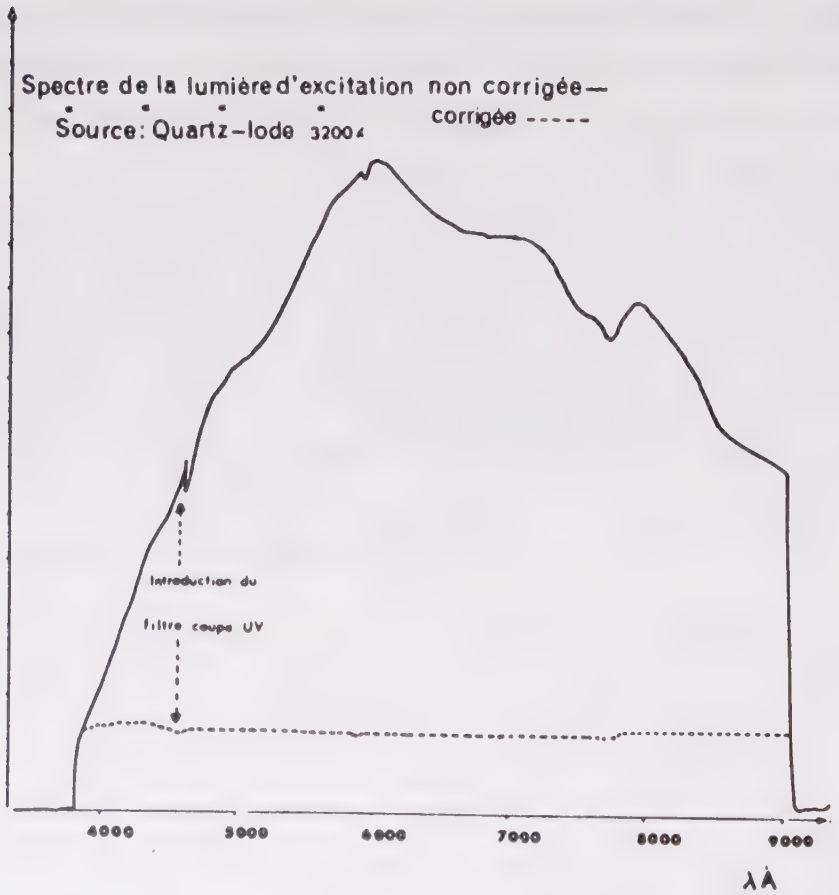


Fig. II.8. Spectre énergétique de la lumière d'excitation

II.4.3. Résultats expérimentaux.

a) Correction d'excitation

Avec une deuxième thermopile située à la place de la cuve à fluorescence, nous avons enregistré l'intensité lumineuse d'excitation sans et avec le système d'asservissement, et ceci pour les deux lampes utilisées. Dans chaque cas nous avons introduit, pour le visible, un filtre passe-haut coupant l'ultraviolet afin d'éliminer le deuxième ordre du réseau ; les figures II.8 et II.9. représentent ces enregistrements. On peut constater que le flux corrigé subit encore des fluctuations de l'ordre de 40 % avec l'arc au Xénon ; ceci est dû en particulier à la présence de raies introduisant de fortes pentes. Il faudrait pour améliorer le taux d'ondulation, soit diminuer la vitesse d'exploration, soit diminuer la constante de temps du système d'asservissement. Cette dernière est relativement importante (de l'ordre de 20 s) due presque exclusivement au galvanomètre utilisé en régime amorti à cause de la faible résistance de la thermopile.

Avec la lampe quartziode, les fluctuations sont réduites à 17 % pour l'ensemble du spectre (de 3 000 à 8 000 Å) et de 12 % de 4 200 à 8 000 Å. On peut constater d'autre part des zones (6 000 - 7 500 Å par exemple) où les fluctuations sont réduites à quelques pour cent. Ce domaine est particulièrement intéressant puisqu'il correspond à une zone d'absorption de la chlorophylle.

Dans les deux cas on peut constater qu'une grande partie de l'énergie lumineuse est perdue, la régulation étant effectuée autour de l'énergie minimum dans le domaine considéré. Ici encore la lampe quartziode est préférable à l'arc au Xénon pour le visible.

b) Correction en analyse

La figure II.10 représente la sensibilité énergétique du système d'analyse et la courbe inverse qui est réalisée dans la correction. On peut constater que dans la partie 6 000 - 8 000 Å la sensibilité varie très rapidement ; ceci est dû au fait que le réseau (blazé à 5 000 Å) et le photomultiplicateur sont dans une région d'efficacité décroissante. Ceci pourrait être amélioré soit en prenant un réseau blazé à une longueur d'onde supérieure, soit en utilisant un photomultiplicateur ayant une réponse du type S 1 (7102 RCA par exemple). Cette dernière solution présente un incon-

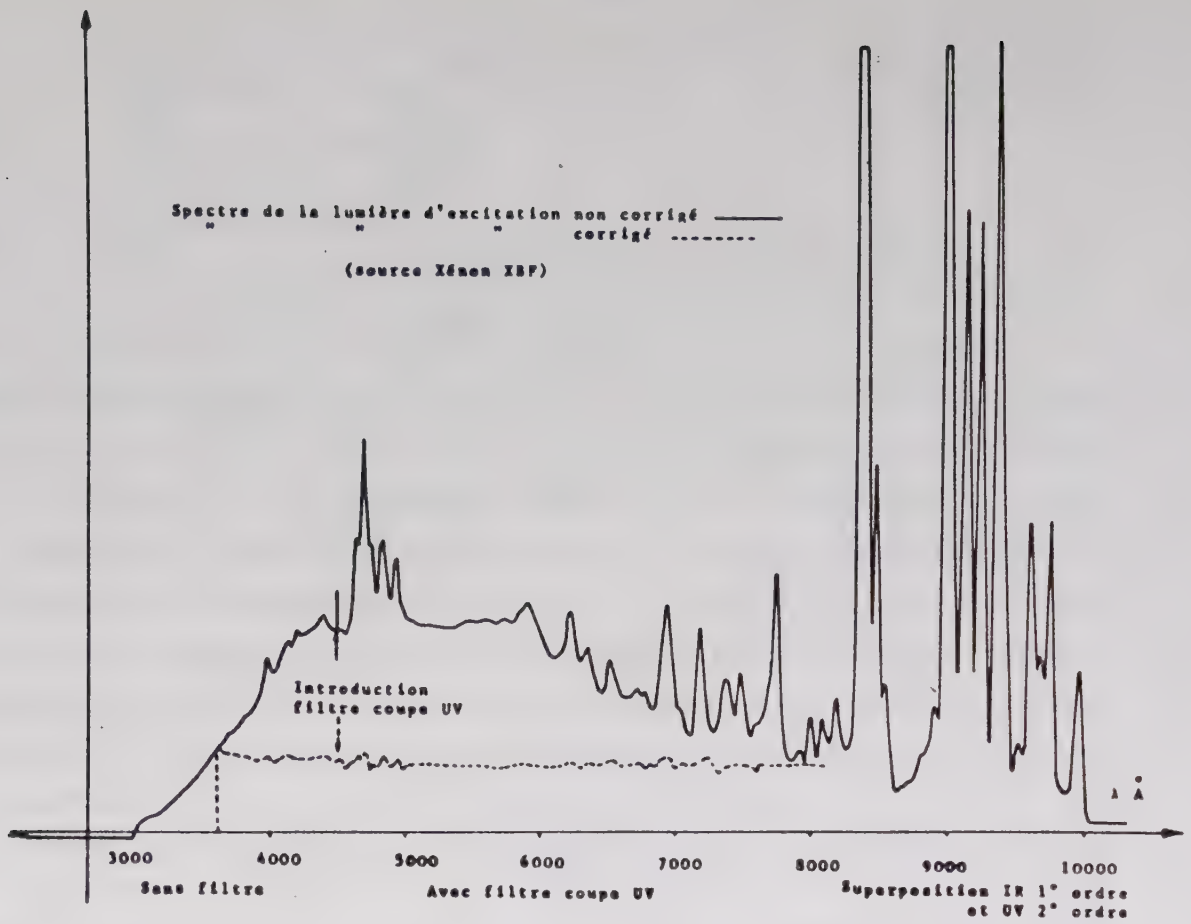


Fig .III .9 . Spectre énergétique de la lumière d'excitation(arc au Xénon)

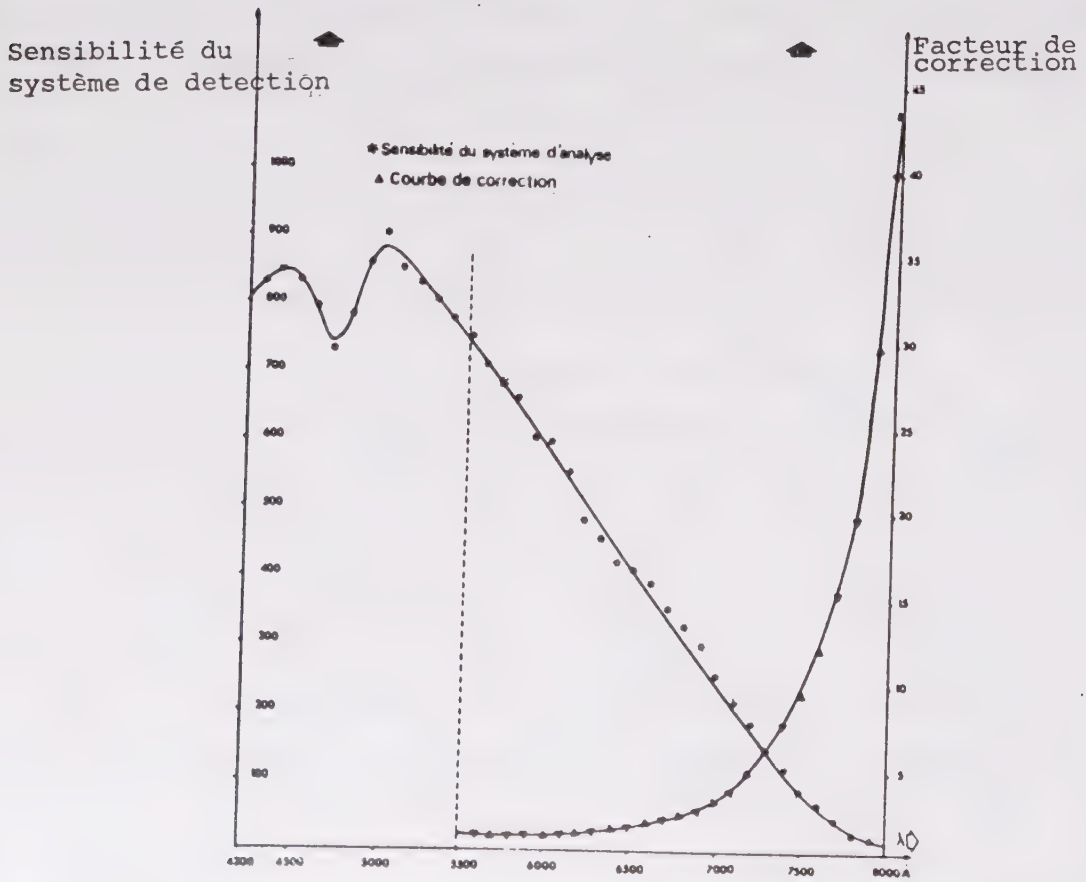


Fig.III .10 Caractéristique du système d'analyse

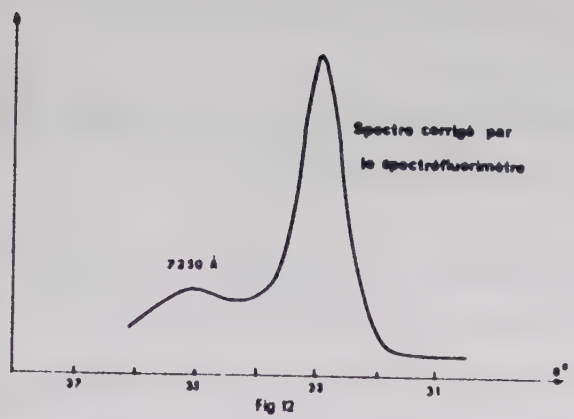


Fig. II.11. Spectre d'émission de fluorescence de la chlorophylle a avec le système de correction.

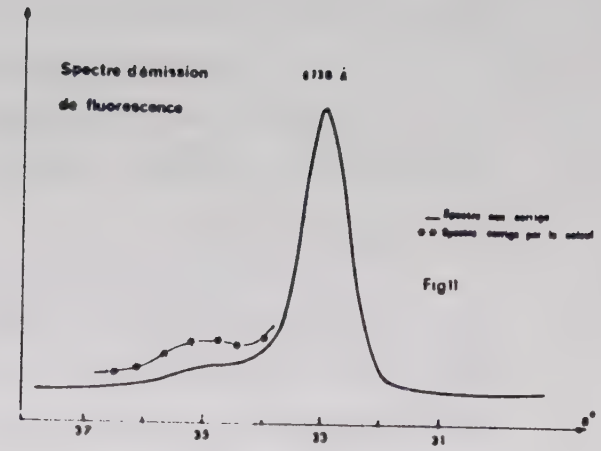


Fig. II.12. Spectre d'émission de fluorescence de la chlorophylle a sans correction (—) et corrigé par le calcul (x—x)

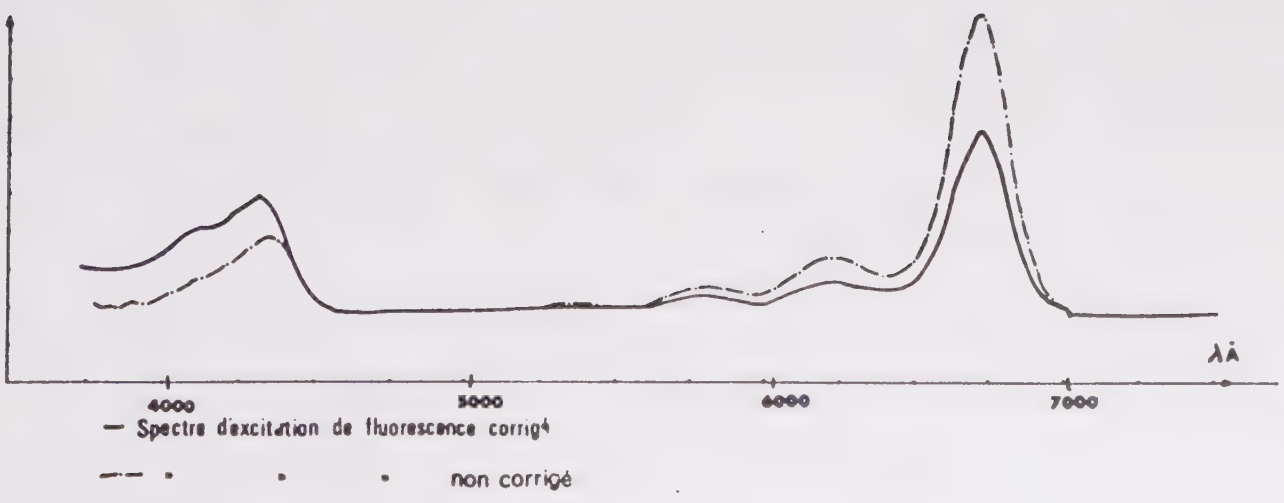


Fig. II.13. Spectre d'action de fluorescence de la chlorophylle a avec ou sans correction d'excitation.

vénient car ce photomultiplicateur, outre un bruit de fond et un courant d'obscurité importants qui nécessitent un refroidissement, possède un rendement quantique très faible, même vers le maximum rouge (8 000 Å).

c) Application à la chlorophylle

Nous avons testé notre spectrofluorimètre avec une solution de chlorophylle a (benzène, concentration 5×10^{-6} mole/litre).

Spectre d'émission.

Les figures II.11 et II.12 représentent le spectre d'émission de la chlorophylle sans correction, avec correction, par le calcul, et avec correction automatique. On constate que l'épaulement à 7 250, image de l'épaulement en absorption à 6 160 (loi de Stokes) est bien présent dans le spectre corrigé.

Spectre d'action.

La figure II.13 montre les spectres d'action avec et sans le système de stabilisation en excitation. On peut constater une différence très importante entre les deux enregistrements ; mais il est difficile de faire une comparaison simple avec le spectre d'absorption à cause de l'effet de filtre interne d'une part, et d'autre part, du fait que le rendement de fluorescence est un rendement quantique, alors que la stabilisation est faite en énergie.

BORRESEN H. C.
Acta. Chem. Scand. 19 (2089) 1968

CHAUVET J. P., JOURNEAUX R., VIOVY R.
Jal. Chim. Phys. 71 (879) 1974

HAUGEN G.R., MARCUS R. J.,
Appl. Optics 3 (1049) 1964

HOCHAPFEL A., BERCHET D., VIOVY R.
Biochim. Biophys. Acta. 222 (180) 1970

HOWERTON H. K.
In fluorescence - G. G. GUILBAULT éd. Inc. New-York
p. 233 1967

KRAUZMAN M., KARA R.
Jal. Phys. Appl. 1 (257) 1966

NORMANDIN G., DONNAT P., JOURNEAUX R.
Jal. Phys. Appl. 6 (147) 1971

ROSEN P., ELDELMANN G. M.
Rev. Sci. Inst. 36 (809) 1965

STUPP E. H.
Rev. Sci. Inst. 33 (1215) 1962

VERNON L. P., SEELY G. R.
In the Clorophylls Acad. Press Inc. New-York
chap. 2 1966

WITHOLT B., BRAND L.
Rev. Sci; Inst. 39 (1271) 1968

Chapître III. Etude de formes agrégées.

Alors que les pigments se présentent sous forme monomère dans les solutions diluées en milieu polaire, il existe plusieurs méthodes pour obtenir une structure plus organisée. Deux types de solvants ont été utilisés ici : mélanges binaires eau-substance polaire d'une part, milieu apolaire d'autre part.

I. ETUDE DANS LES MELANGES BINAIRES.

L'addition d'eau à une solution organique de chlorophylle a conduit à une modification de ses propriétés spectroscopiques, particulièrement à un élargissement des bandes d'absorption et à une diminution de la fluorescence (LOVE 1962, LITVIN 1968).

L'évolution de ces propriétés a été étudiée systématiquement par quatre techniques spectroscopiques : absorption de la lumière, fluorescence, étude des états triplets, diffusion de la lumière. Nous avons utilisé les solvants organiques suivants : acétone, pyridine, méthanol, éthanol, polyéthylène glycol 400 (PEG 400) et triton X 100.

La dissolution directe de la chlorophylle a dans un mélange eau solvant organique est difficile quand la teneur en eau est importante. Les solutions sont donc préparées de la façon suivante : les solutions de chlorophylle obtenues après élution de la colonne de chromatographie sont évaporées à sec, redissoutes dans du benzène anhydre puis évaporées à nouveau. La chlorophylle solide ainsi préparée est dissoute dans le solvant organique pur. La solution est alors diluée avec un mélange binaire eau-solvant organique pour obtenir la concentration convenable en eau.

Les concentrations utilisées sont les suivantes :

7 à 8 10^{-6} mole kg^{-1} pour TX 100 et PEG 400

environ 8 10^{-6} mole l^{-1} pour les autres solvants

A ces concentrations dans les solvants organiques purs, la chlorophylle se présente sous forme monomère.

Toutes les mesures ont été faites à la température ordinaire.

I.1. Etude par absorption. (HOCHAPFEL et al. 1969)

La bande rouge de la chlorophylle a étant une bande simple dans les solvants organiques purs, l'évolution de ses caractéristiques permet d'expliquer les modifications du comportement de la molécule de ce pigment. Trois grandeurs ont été étudiées : la densité optique du maximum (D), la longueur d'onde du maximum (λ_M), la largeur à mi-hauteur ($\Delta\lambda$).

Le triton X 100 est le solvant qui donne le comportement le plus simple. La figure III.1 montre l'évolution de tout le spectre en fonction de la teneur en eau, et la figure III.2. traduit les variations des trois grandeurs caractéristiques de la bande rouge. On constate une variation continue et peu importante des paramètres dans tout le domaine de concentration en eau.

Les figures III.3 à III.6 montrent l'évolution globale des spectres d'absorption pour méthanol, acétone et eau. Les figures 7 à 10 traduisent l'évolution des grandeurs D, λ_M, $\Delta\lambda$ en fonction de la teneur en eau pour éthanol, méthanol, acétone et PEG 400. On peut en déduire l'existence de trois domaines suivant le pourcentage d'eau :

★ pour les teneurs en eau inférieures (à 30 à 60 % suivant le solvant) les trois grandeurs caractéristiques varient peu par rapport aux valeurs dans le solvant pur = légère augmentation de $\Delta\lambda$ et λ_M, légère diminution de D.

★ pour les teneurs en eau moyennes (par exemple 45 - 70 % pour l'acétone) on observe simultanément plusieurs phénomènes.

- augmentation rapide de λ_M
- diminution de D
- augmentation de $\Delta\lambda$

Ces phénomènes sont accompagnés d'une légère opalescence caractéristique d'une diffusion plus marqué, diffusion qui peut être en partie responsable de la diminution de D.

Pour l'acétone et le méthanol en particulier, une deuxième bande apparaît vers les grandes longueurs d'onde (vers 730 - 750 nm selon le solvant ou les expériences).

Pour cette raison nous avons étudié en détail des solutions de chlorophylle dans le méthanol aqueux et dans la zone intermédiaire. Pour une concentration d'eau de 43,2 %, la plus favorable à la formation d'une deuxième bande, nous avons tracé les spectres de la chlorophylle a , provenant de deux préparation différentes, Ch I et Ch II. Les expériences ont donné les deux maxima pour Ch I à 669 et 741 nm et pour Ch II à 672 et 723 nm.

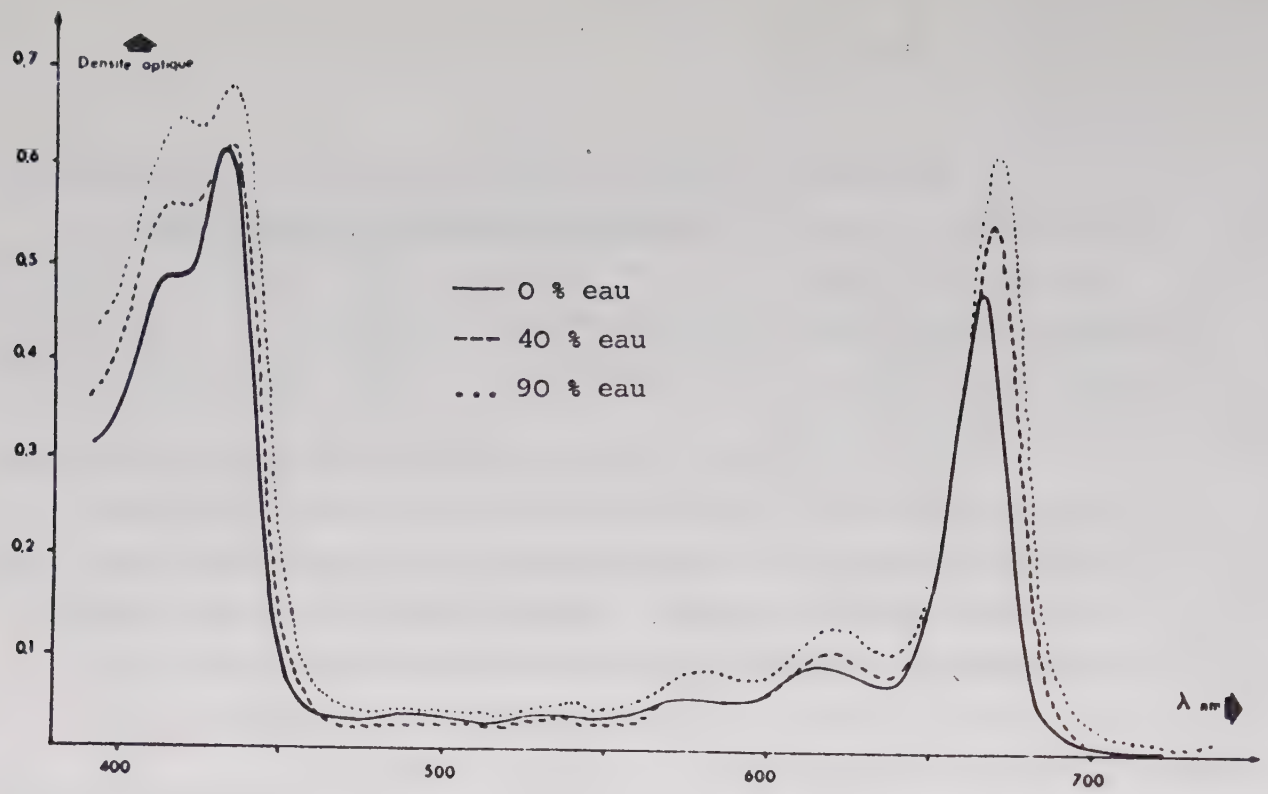


Fig. III.1. Evolution du spectre d'absorption des mélanges eau-Triton X 100

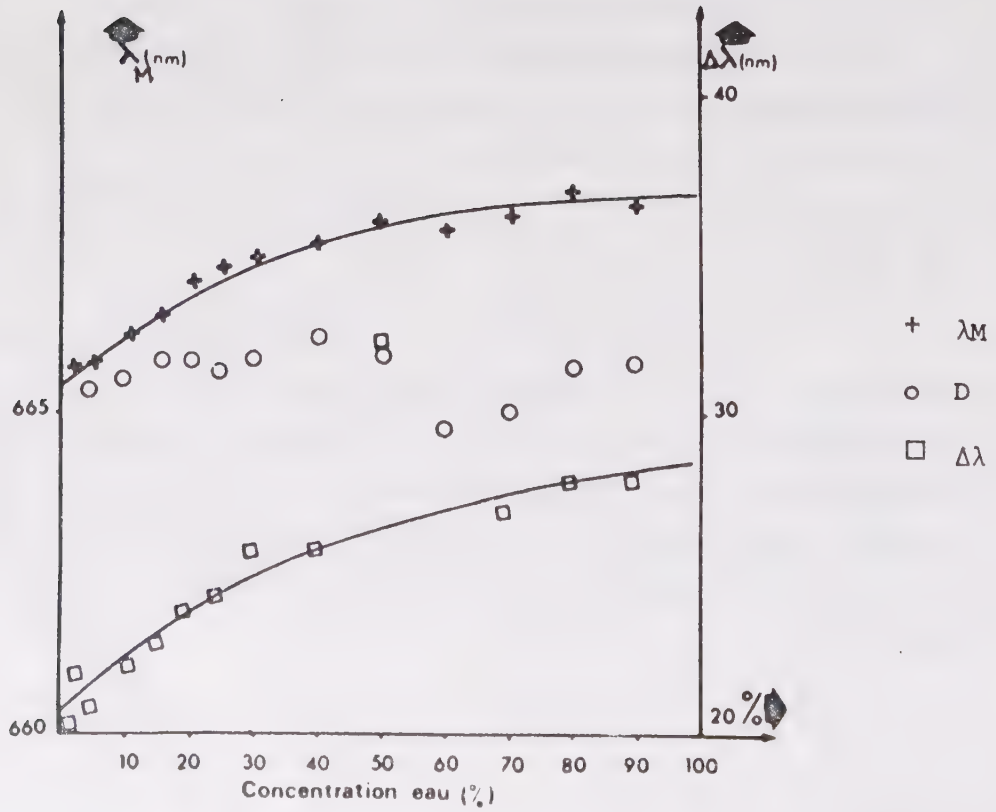


Fig. III.2. Evolution des caractéristiques de la bande rouge des mélanges

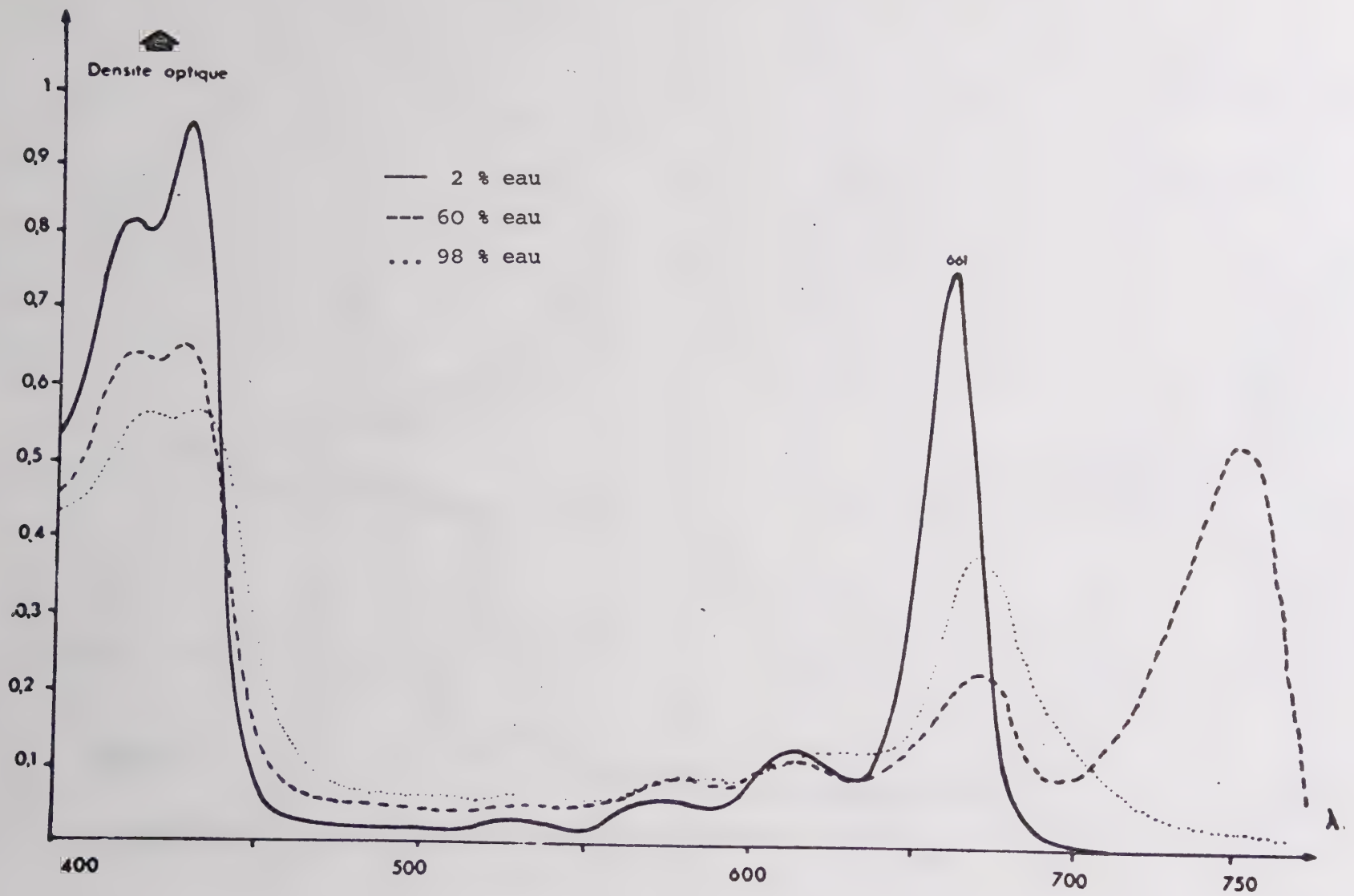


Fig. III.3. Spectres d'absorption de Chla dans des mélanges acétone - eau.

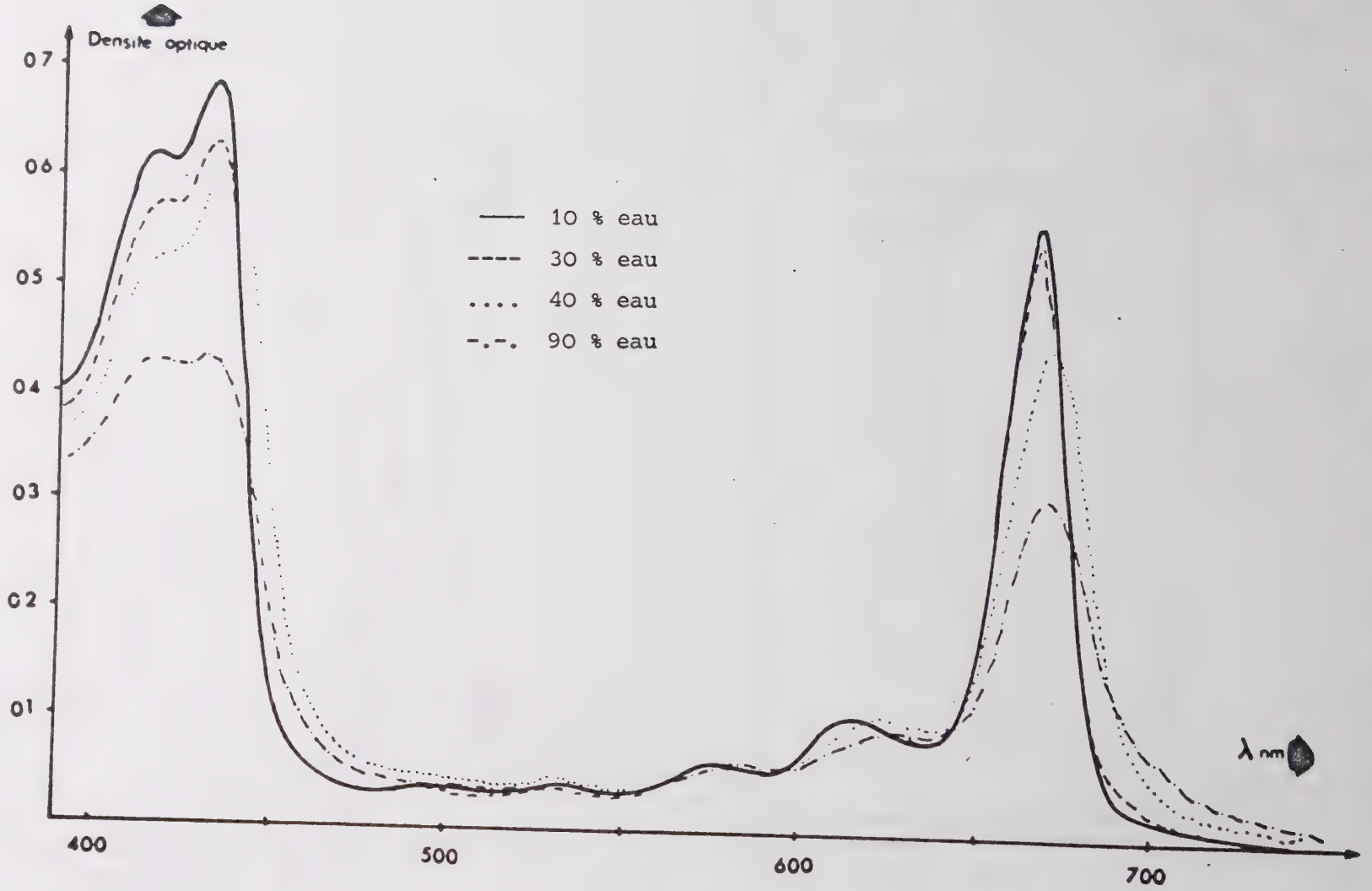


Fig. III.4. Spectres d'absorption de Chla dans des mélanges eau - PEG 400.

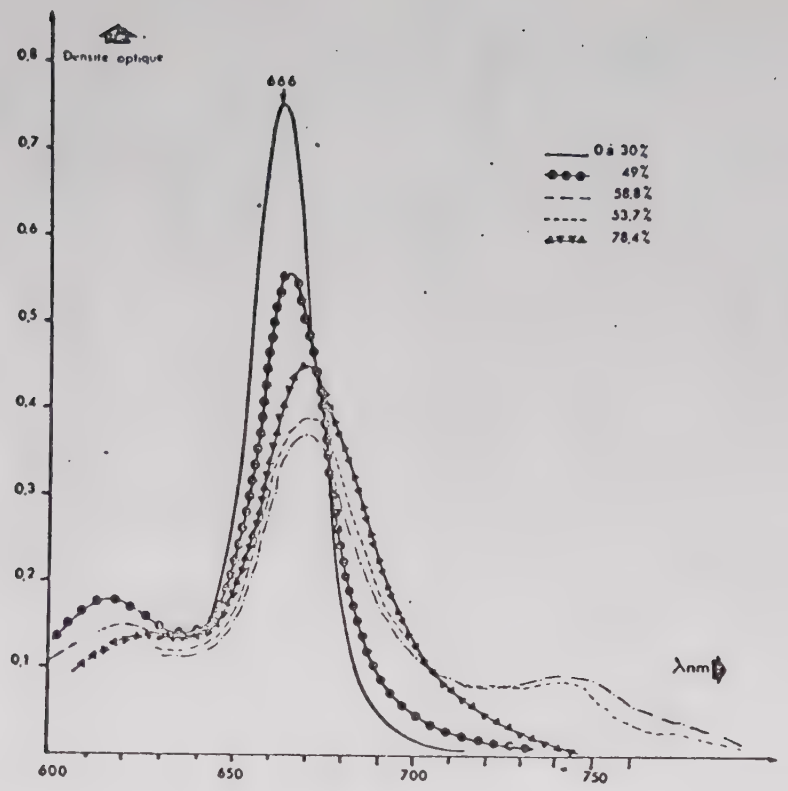


Fig. III.5. Spectres d'absorption de Chla dans les mélanges méthanol - eau.

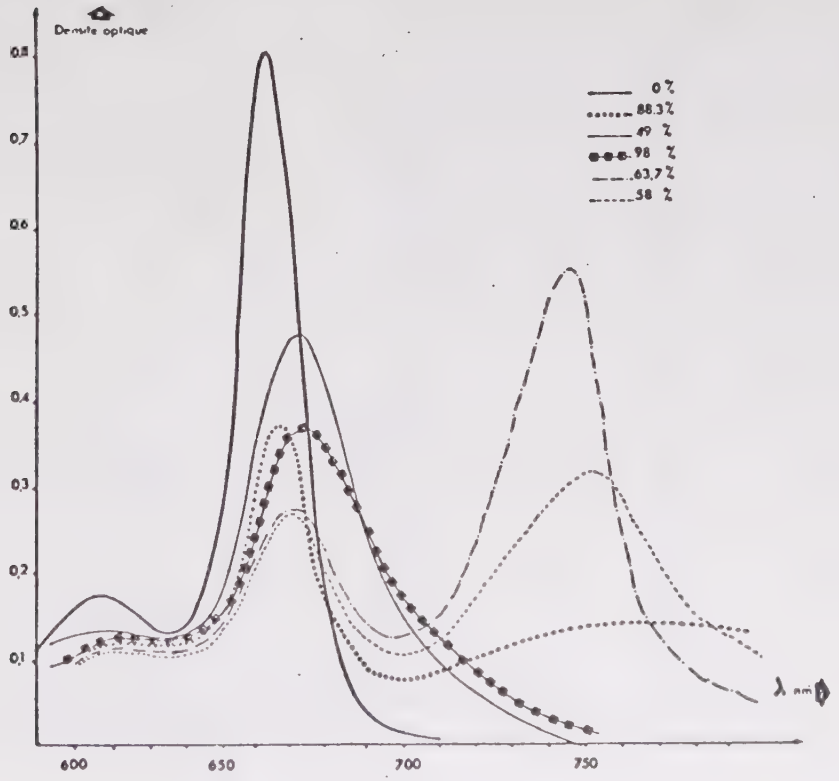


Fig. III.6. Spectres d'absorption de Chla dans les mélanges acétone - eau.

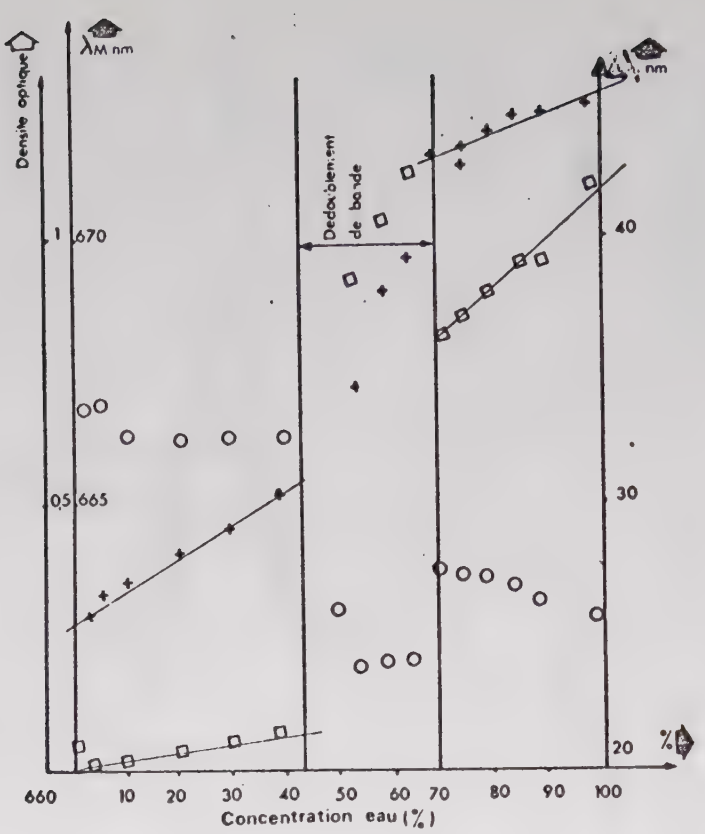


Fig. III.7. Caractéristiques de la bande rouge de Chla dans les mélanges acétone - eau.

Fig. III.8. Caractéristiques de la bande rouge de Chla dans les mélanges eau - PEG.

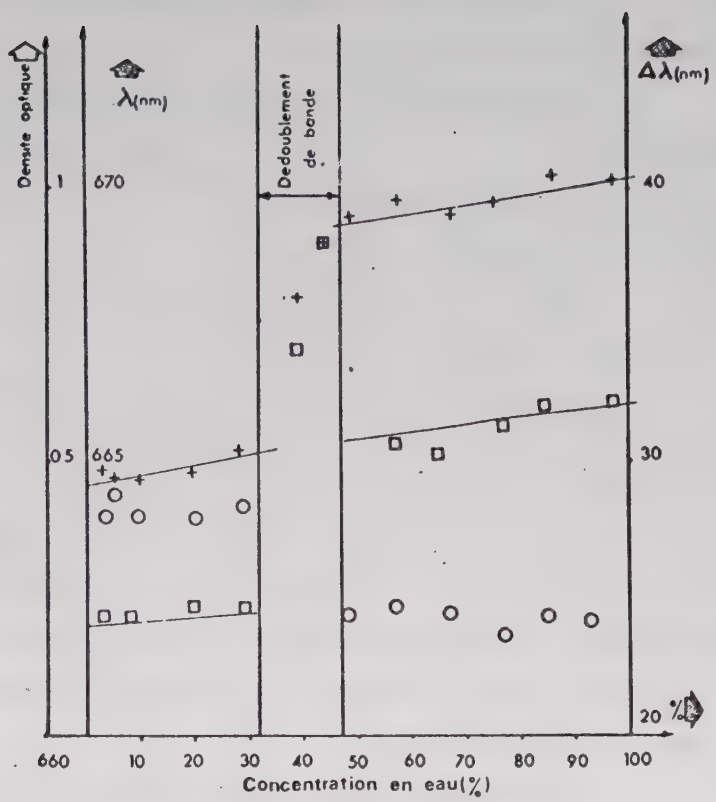


Fig. III.9. Caractéristiques de la bande rouge de Chla dans les mélanges méthanol - eau.

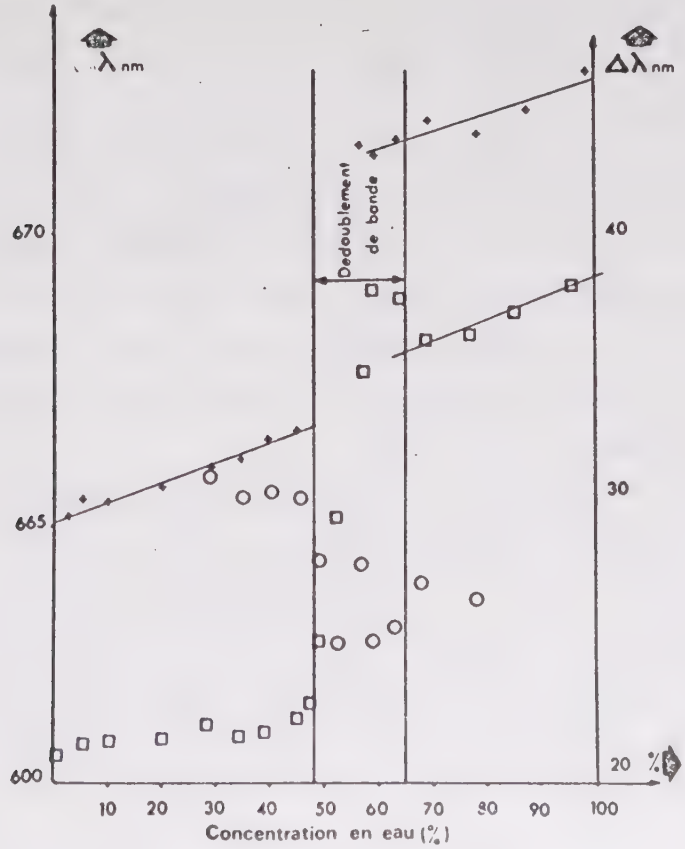


Fig. III.10 Caractéristiques de la bande rouge de Chla dans les mélanges eau - éthanol.

Les spectres d'absorption dans les solvants purs sont identiques pour Ch I et Ch II.

Les rapports des densités optiques D des deux bandes à 43,2 % d'eau sont :

pour Ch I D741/D669 = 0,79

pour Ch II D723/D672 = 0,78

Après une centrifugation de ces solutions légèrement troubles, à 5 000 t/mn, D741/D669 est de 0,13.

Le spectre de la solution Ch II montre également une forte diminution du deuxième pic et le premier pic est à 669 nm. Le rapport D 723/ D 669 est de 0,25. Ceci montre que la deuxième bande disparaît à la centrifugation. Nous avons ensuite étudié l'effet d'une dilution de la solution de chlorophylle à 43,2 % d'eau par du méthanol, pour arriver à 21,6 % d'eau et nous avons comparé le spectre à ceux obtenus pour 19,2 et 24 % d'eau. Les spectres sont identiques. Le composé qui donne le deuxième pic est donc soluble dans le méthanol.

Inversement, nous avons dilué notre solution avec de l'eau jusqu'à 71,6 %. Le spectre d'absorption est resté le même que celui qui correspond à 43,2 %. Il est donc différent de ceux qui correspondent à 67,2 et 76,8 % d'eau. On en déduit que la forme obtenue est insoluble dans l'eau. Il est donc très important de préparer les solutions comme nous l'avons indiqué.

Nous avons trouvé dans les solutions aqueuses d'éthanol, une deuxième bande moins accentuée. Sa position varie de 742 à 748 nm à partir de Ch II. Sa plus grande intensité se situe à 63,7 % d'eau où le rapport des deux bandes D 742/D 672 est de 0,22.

Dans l'acétone, nous avons également observé une deuxième bande dans un domaine assez étendu de la zone intermédiaire. Sa position varie entre 746 et 767 nm.

Dans le THF, nous avons constaté une faible diffusion des solutions de la zone intermédiaire, mais pas de deuxième bande.

On doit noter que l'apparition de la deusième bande, n'est pas toujours aussi nette. Il peut y avoir dans certains cas, une absorption continue. Nous avons également constaté que la zone où l'on trouve cette deuxième bande d'absorption, varie légèrement d'une expérience à l'autre.

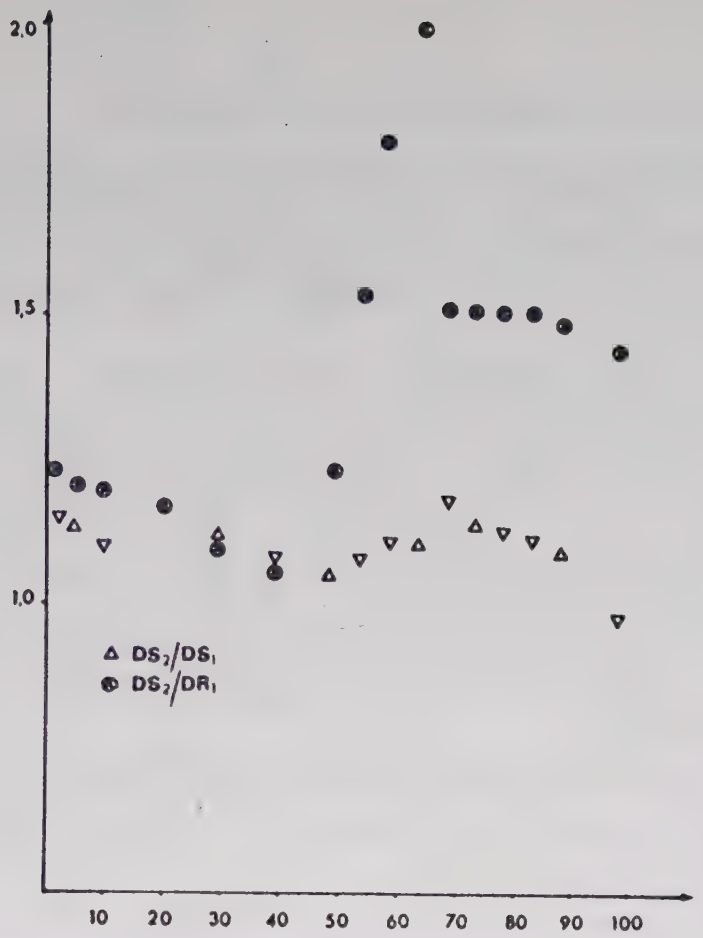
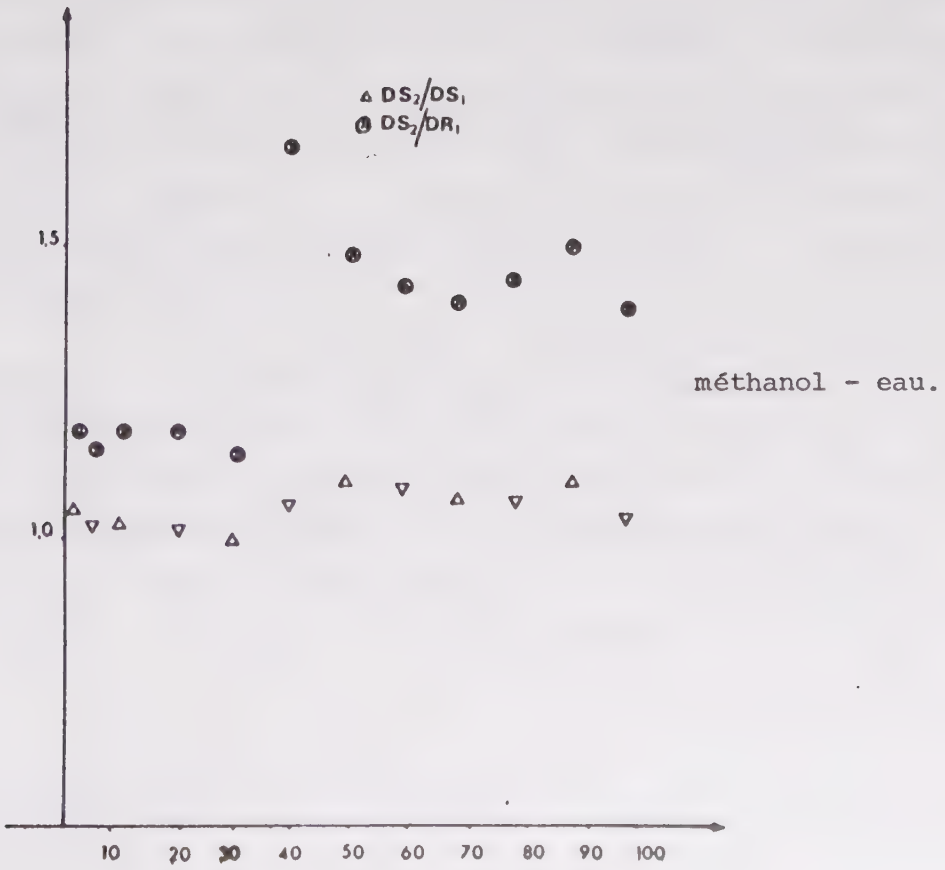


Fig. III.11. Comparaison bandes de Soret - bande rouge pour Chla dans deux séries de mélanges binaires.



* pour les plus grandes teneurs en eau, le spectre d'absorption retrouve une forme classique, avec variation très lente des 3 paramètres en particulier λ_M se situe pour les différents solvants au voisinage de 670.672 nm.

Les solutions pyridine - eau se distinguent légèrement des autres exemples. Si on retrouve bien pour $\Delta\lambda$ et D un comportement voisin avec présence de trois domaines, λ_M ne présente par contre aucune variation importante dans la zone intermédiaire. Ceci peut s'expliquer par le fait que λ_M se situe aux environs de 670 nm dans le solvant pur et pour les faibles teneurs en eau (valeurs trouvées pour les autres mélanges à forte teneur en eau) alors qu'il n'est que 665 nm pour les autres solvants dans ce domaine.

Les modifications des bandes de Soret sont beaucoup plus complexes. On constate avec l'augmentation de la teneur en eau :

- un déplacement vers le rouge
- un élargissement très marqué, à partir de la zone intermédiaire
- une diminution de la densité optique.

Les figures III.11 et III.12 donnent un exemple de l'évolution des rapports DS_2/DS_1 et DS_2/DR, DS_1, DS_2 et DR représentant respectivement les densités optiques pour la bande de Soret principale, la deuxième bande de Soret et la bande rouge.

I.2. Etude par fluorescence (JOURNEAUX et al. 1969).

Nous avons déterminé pour chaque solvant, deux caractéristiques des spectres de fluorescence : la longueur d'onde du maximum λ_M et l'intensité de ce maximum F_M.

Les spectres ont été enregistrés à la température ordinaire.

La concentration en chlorophylle a des solutions aqueuses était de $7{,}9\ 10^{-6}$ mole/l pour l'acétone, la pyridine, le tétrahydrofuranne (THF), le méthanol et l'éthanol. Dans le polyéthyléneglycol 400 (PEG 400) et le triton X 100, elle variait respectivement entre 7 et $5\ 10^{-6}$ mole/kg et 6 et $8\ 10^{-6}$ mole/kg.

La première série de figures III.12 à III.15 donne quelques courbes de fluorescence pour les diverses solutions aqueuses d'acétone, de pyridine, de méthanol et de triton X 100.

La deuxième série de figures III.16 à III.19 donne λ_M et F_M en fonction du pourcentage d'eau dans les mêmes solvants.

Les spectres de fluorescence dans ces divers solvants ont une forme classique (VERNON et SEELY). A une bande principale, qui se situe entre 670 et 680 nm, s'ajoute une bande environ 10 fois moins intense dont le maximum se trouve aux environs de 740 nm. On retrouve ainsi l'image de la bande d'absorption rouge et de son premier satellite.

Le rendement de fluorescence caractérisé par l'intensité du maximum principal, diminue légèrement quand la teneur en eau augmente, puis tombe brusquement à une valeur non détectable par notre appareil, soit une valeur inférieure au centième du rendement pour le solvant pur. Un seul solvant fait exception, le triton X 100 ; ici le rendement de fluorescence diminue légèrement quand le pourcentage d'eau augmente, mais reste encore égal à 65 % de sa valeur initiale pour une solution à 99 % d'eau.

La longueur d'onde du maximum subit une évolution conforme aux résultats des études d'absorption. Pour la pyridine, λ_M reste constant et égal à 680 nm dans tout le domaine de fluorescence. Pour l'acétone et le THF, λ_M croît de 5 nm environ (de 670 à 675 et de 671,5à 676,5 nm respectivement), ce qui correspond au déplacement vers les grandes longueurs d'onde de la bande d'absorption rouge. Pour le méthanol et le PEG 400, λ_M reste sensiblement constant (677et 675 nm respectivement) alors qu'elle croît légèrement pour l'éthanol (de 675 à 677 nm). Pour ces 5 solvants, on constate que λ_M diminue légèrement (2 nm environ) au moment où le rendement de fluorescence s'annule. Pour le triton X 100, on constate un déplacement continu vers le rouge de 4 nm entre 0 et 99 % d'eau.

Une remarque intéressante a été faite avec la solution d'éthanol à 60 % d'eau. Les spectres d'absorption et de fluorescence ont été enregistrés immédiatement après la préparation de la solution, puis 4 heures plus tard. Les deux spectres sont identiques pour la fluorescence, mais la bande à 750 nm n'apparaît que sur le deuxième spectre d'absorption.

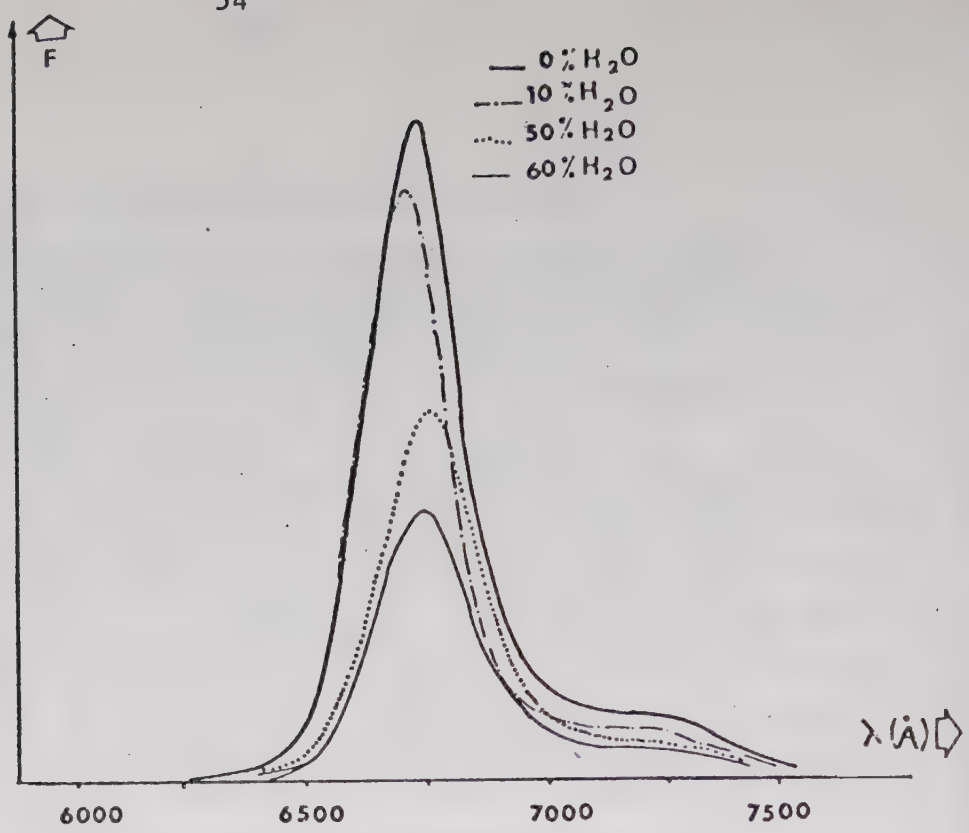


Fig. III.12 Spectres de fluorescence pour les mélanges eau- acétone (la courbe pour 0 % d'eau a été réduire d'un facteur 1,5 et la courbe pour 60 % d'eau a été amplifiée d'un facteur 8,5).

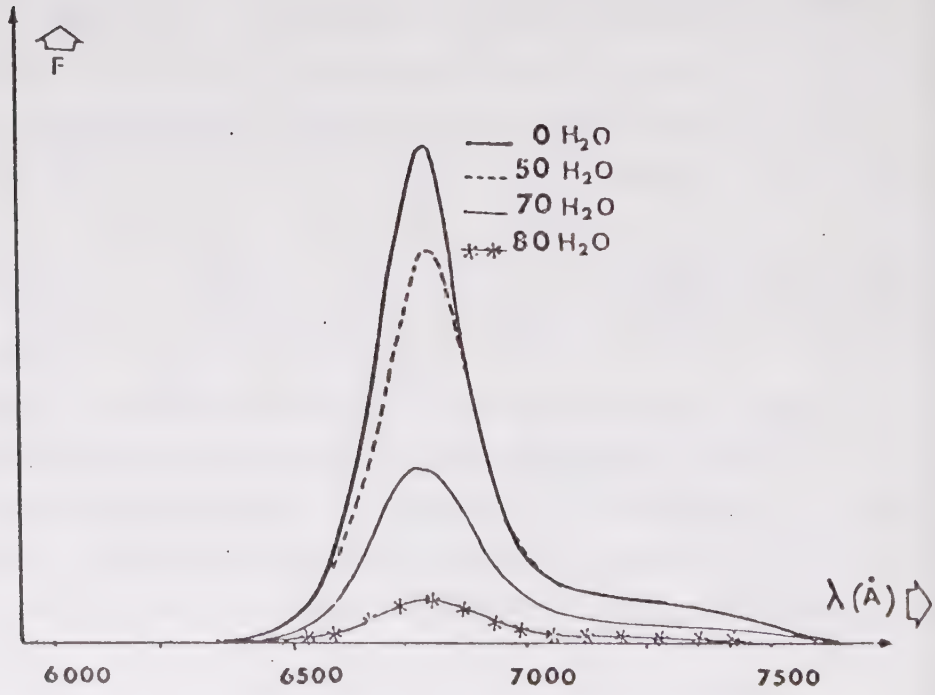


Fig. III.13 Spectres de fluorescence pour les mélanges eau-pyridine (les courbes pour 50, 70 et 80 % d'eau sont amplifiées des facteurs respectifs 1,5 ; 4,5 ; 12,5).

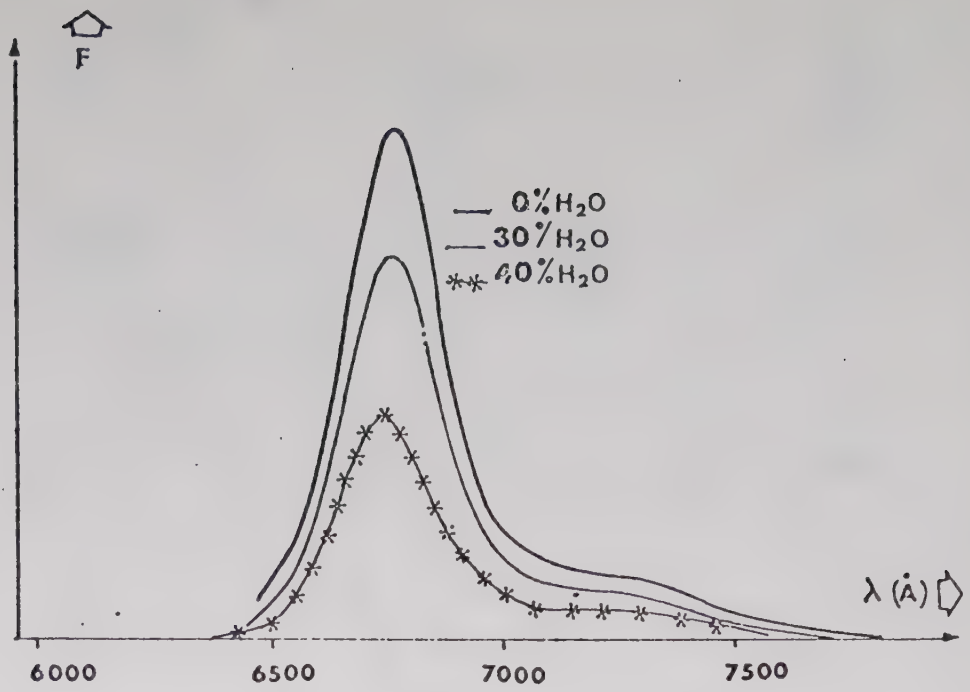


Fig. III.14 Spectres de fluorescence pour les mélanges eau-méthanol (la courbe à 40 % d'eau a été amplifiée d'un facteur 3,5).

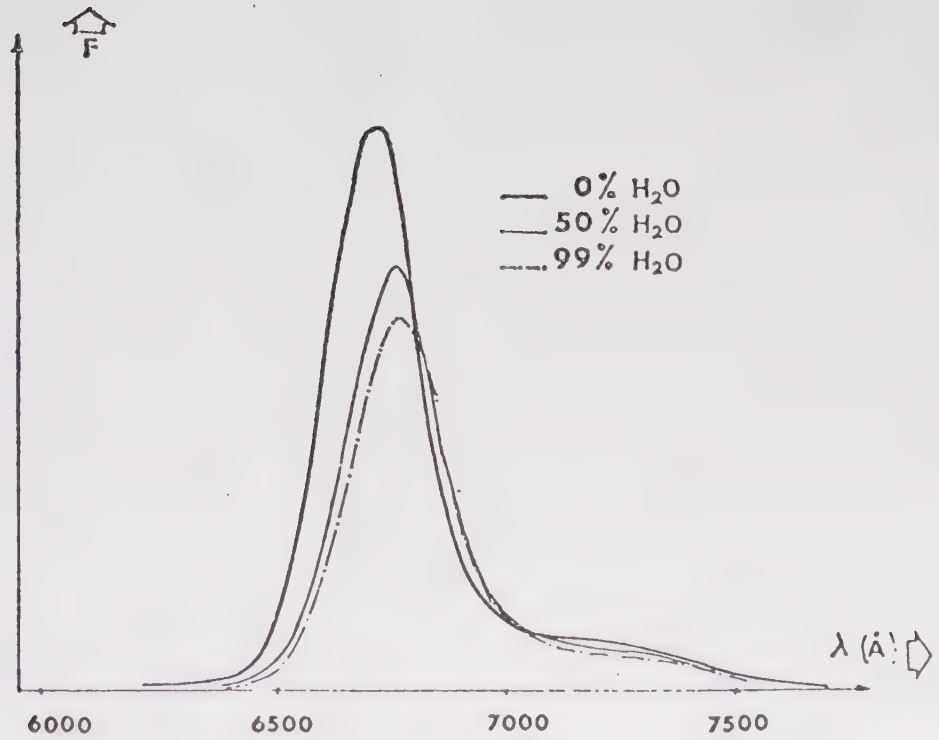


Fig. III.15 Spectres de fluorescence pour les mélanges eau-Triton X 100.

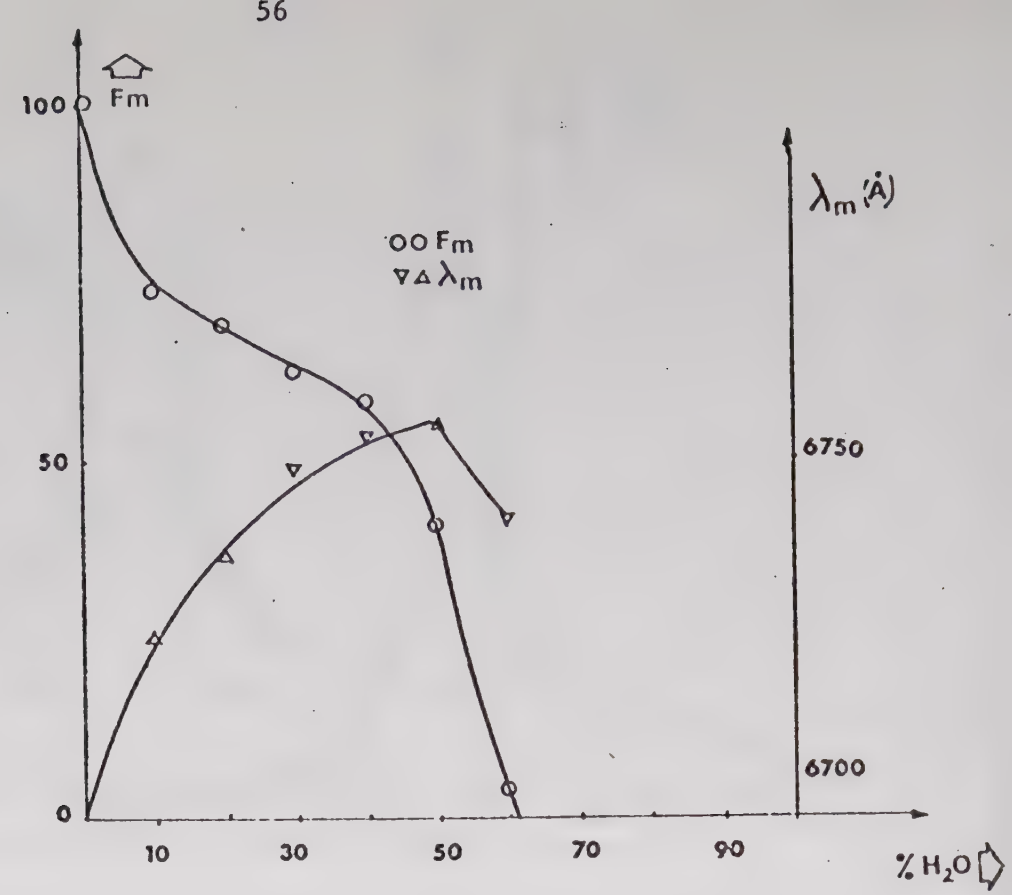


Fig. III.16 Variations de λ_M et F_M dans les solutions eau-acétone.

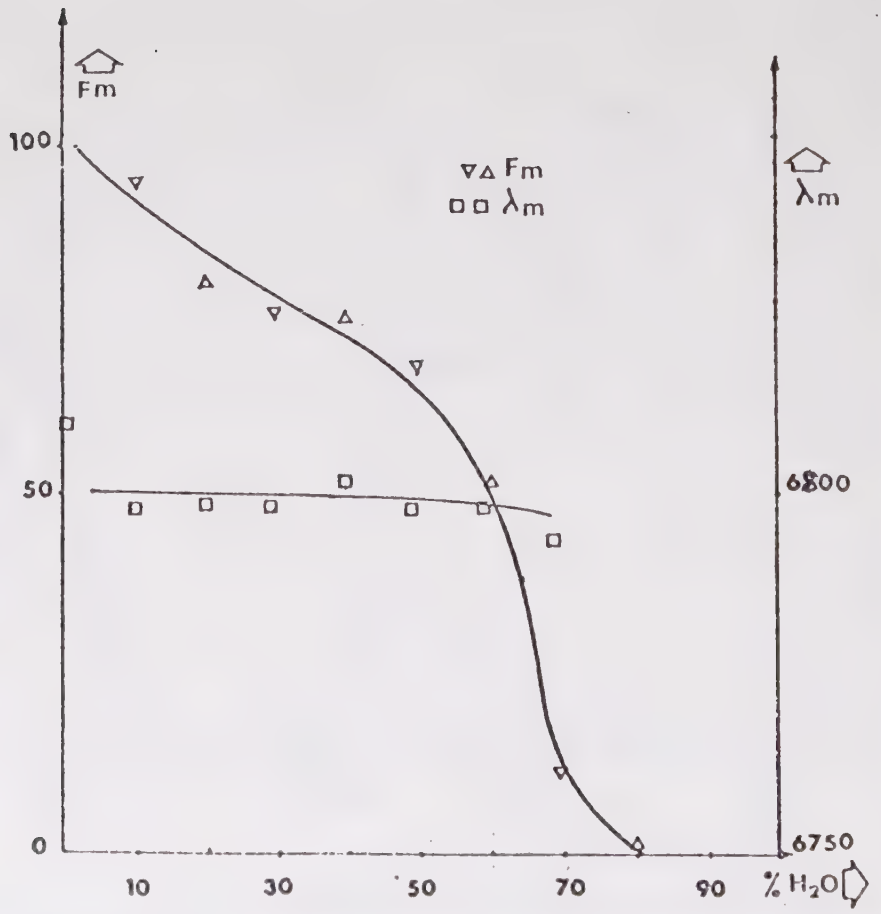


Fig. III.17 Variations de λ_M et F_M dans les solutions eau-pyridine.

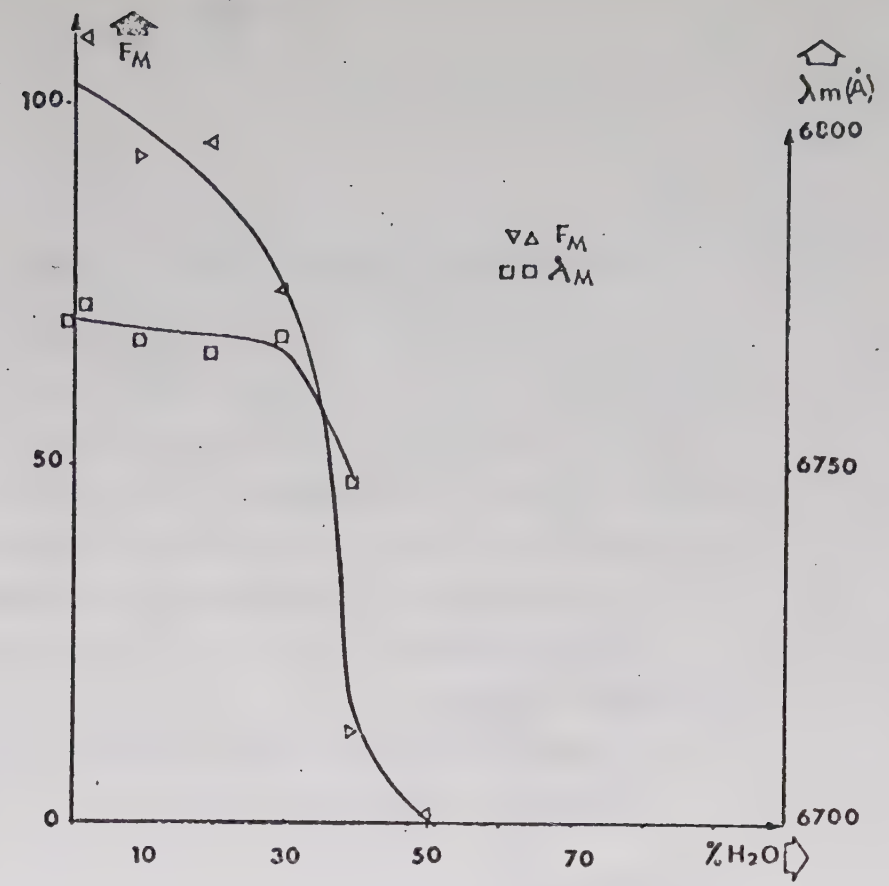


Fig. III.18 Variations de λ_M et F_M dans les solutions eau-méthanol.

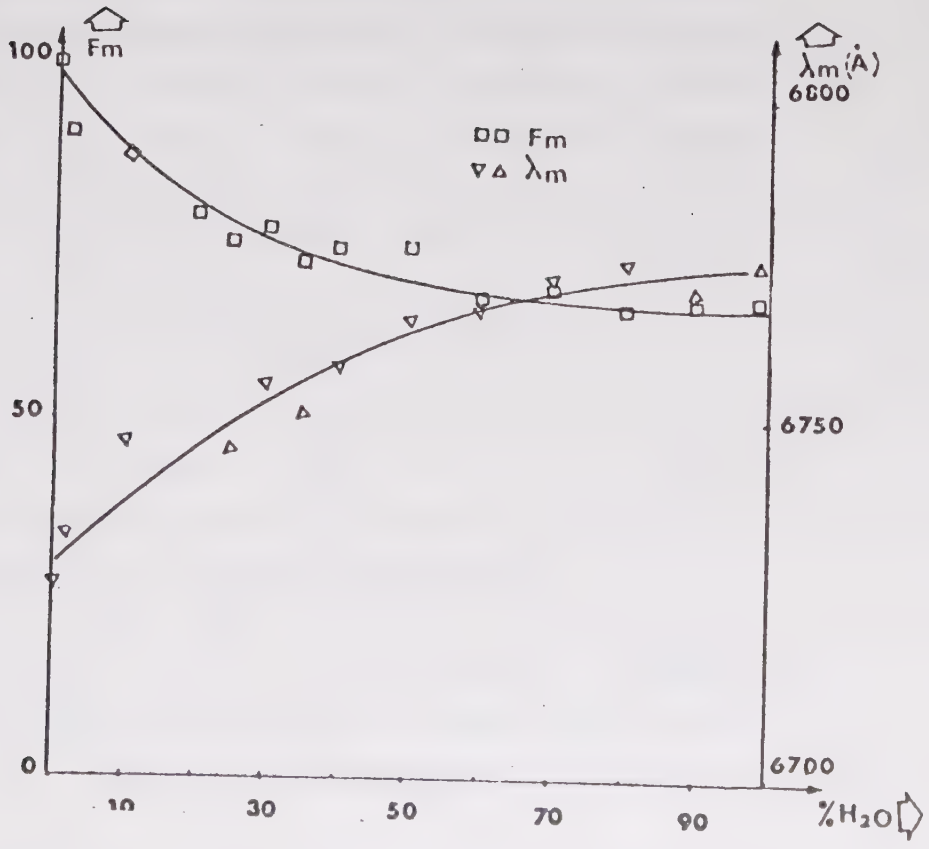


Fig. III.19 Variations de λ_M et F_M dans les solutions eau-Triton X 100.

I.3. Etude des états triplets

Les solutions de chlorophylle a dans les mélanges binaires pyridine - eau, acétone - eau et triton X 100 - eau ont été étudiées par spectrométrie éclair. L'oxygène dissous étant un inhibiteur très efficace des états triplets, il est nécessaire de l'éliminer des solutions avant de procéder à l'irradiation. Le dégazage se fait par une suite de cycles comprenant chacun les opérations suivantes :

- congélation à la température de l'azote liquide (77 K),
- vide secondaire (10^{-5} - 10^{-6} Torr) au dessus de la solution pendant plusieurs minutes,
- réchauffement à la température ordinaire en atmosphère limitée,
- mise sous atmosphère d'azote exempt d'oxygène.

Environ six cycles sont nécessaires pour donner à l'oxygène une concentration telle que son action sur le triplet soit négligeable devant les autres processus de désactivation.

Le refroidissement à l'azote liquide ne pouvant se faire avec la cuve d'analyse, le dégazage est réalisé dans un récipient auxiliaire (fig. III.20). Le transvasement se fait après avoir scellé sous vide la solution dégazée. Les solutions dégazées sont irradiées par un éclair intense ; la présence d'un état triplet et le retour à l'état singulet sont étudiés pour diverses teneurs en eau. Les longueurs d'onde d'analyse (entre 460 et 480 nm) choisies pour cette étude sont celles pour lesquelles l'état triplet et l'état singulet présentent le maximum de différence d'absorption.

Résultats expérimentaux

Les figures III.21 à III.26 montrent pour diverses longueurs d'onde l'évolution du signal triplet enregistré. DO représente la densité optique de la solution due à l'espèce triplet formée ; elle est obtenue à partir des variations de la densité optique de la solution extrapolée à l'instant du maximum de l'éclair, c'est-à-dire environ 20 µs après le déclenchement. On peut estimer que l'état triplet est entièrement peuplé puisque une augmentation de l'énergie de l'éclair ne modifie pas le signal enregistré. τ représente le temps au bout duquel, après le flash, la moitié du pigment est revenue à l'état singulet.

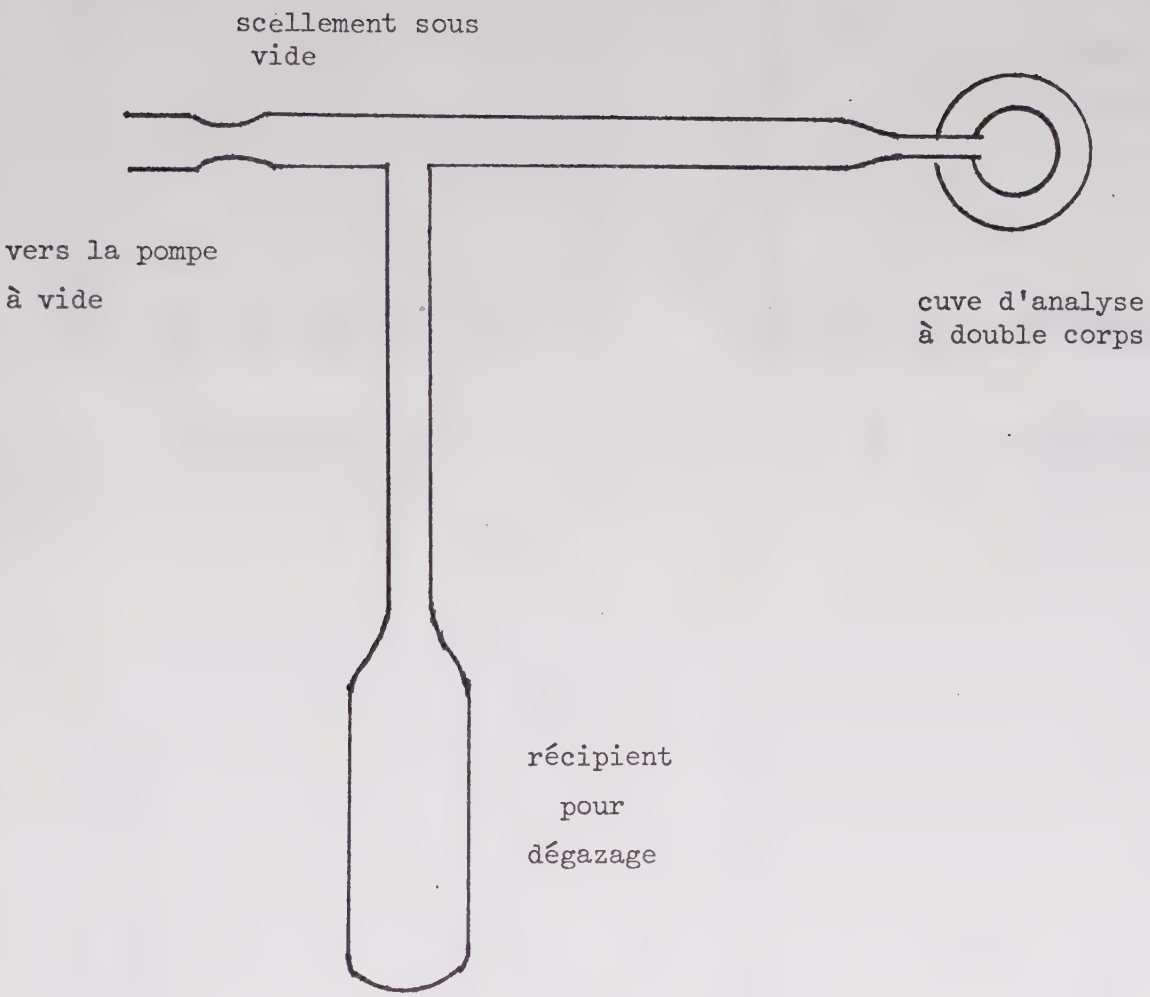
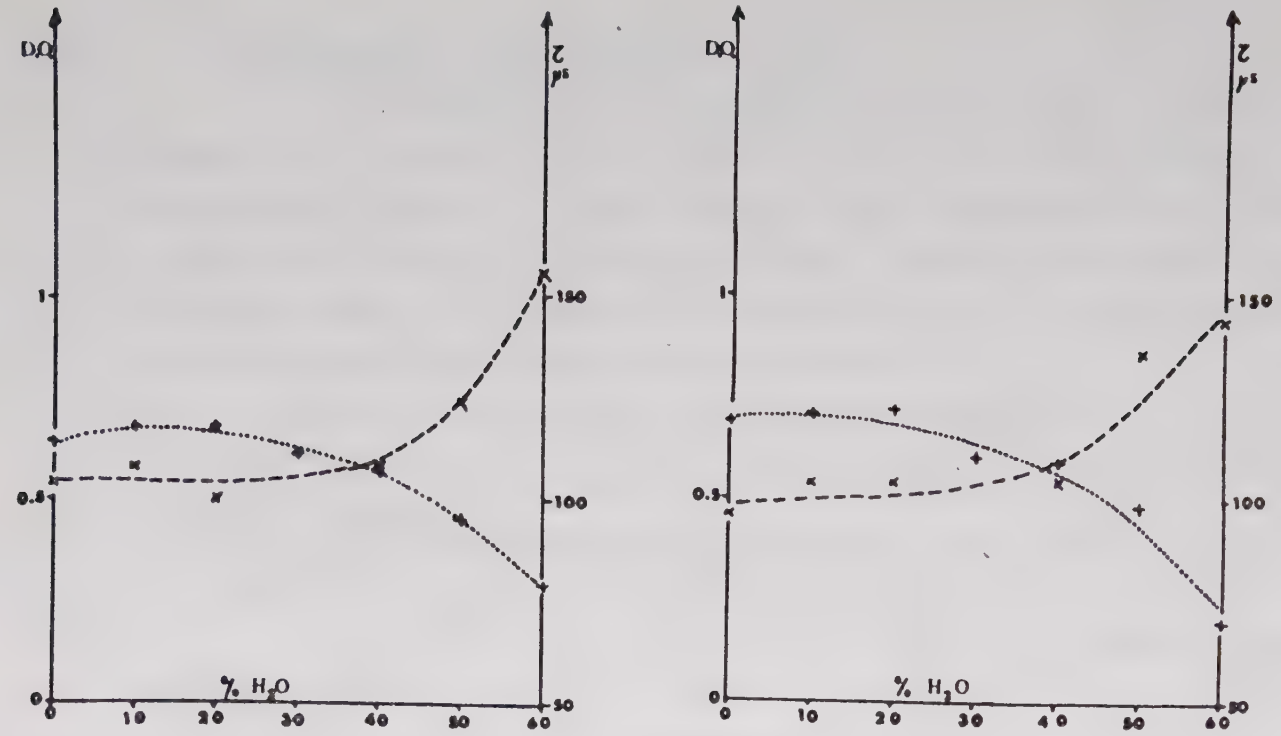


Fig. III. 20 - Dispositif de dégazage des solutions

Fig. III.21. λ = 460 nm
$C = 10^{-5}$ mole l^{-1}

Fig. III.22. λ = 470 nm
$C = 10^{-5}$ mole l^{-1}



Caractéristiques du signal triplet de Chla dans les solutions eau-pyridine.

x τ + D. O.

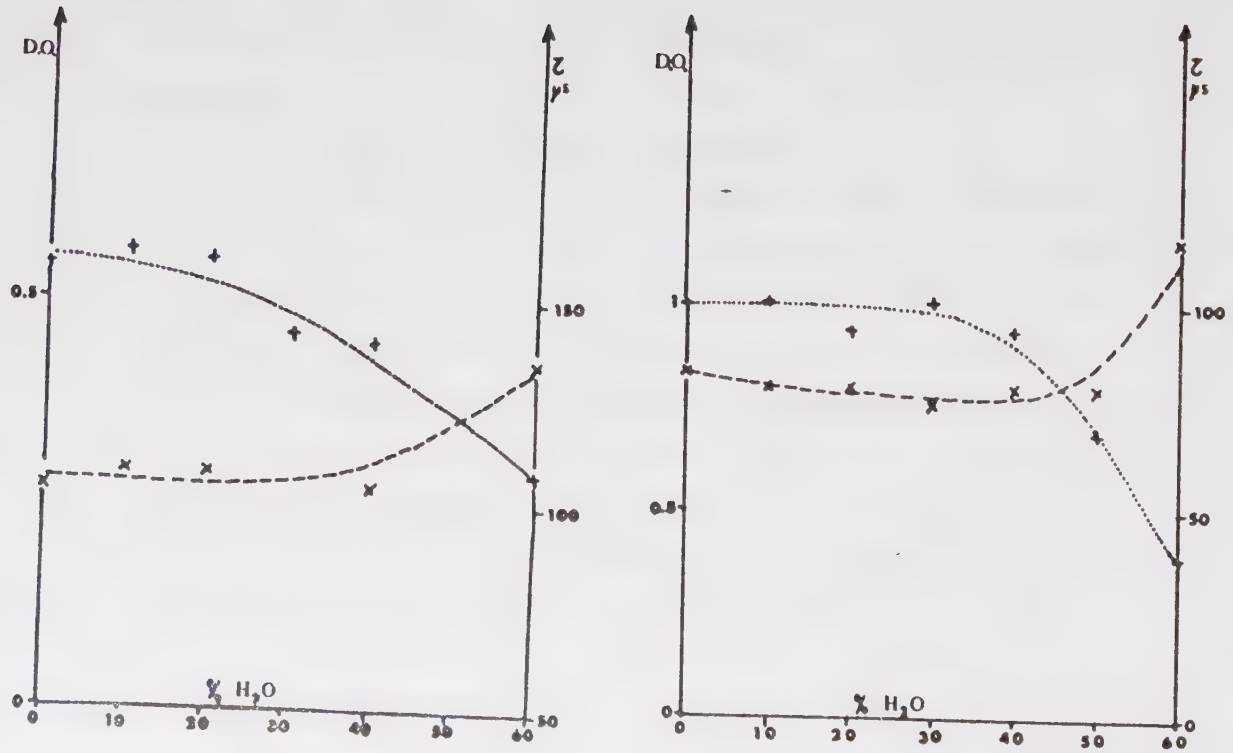


Fig. III.23. λ = 480 nm
$C = 10^{-5}$ mole-l^{-1}

Fig. III.24. λ = 480 nm
$C = 2\ 10^{-5}$ mole-l-1

Caractéristiques du signal triplet de Chla dans les solutions eau-acétone.

x τ + D. O.

Fig. III.25. λ = 480 nm
C = 2 10^{-5} mole-l^{-1}

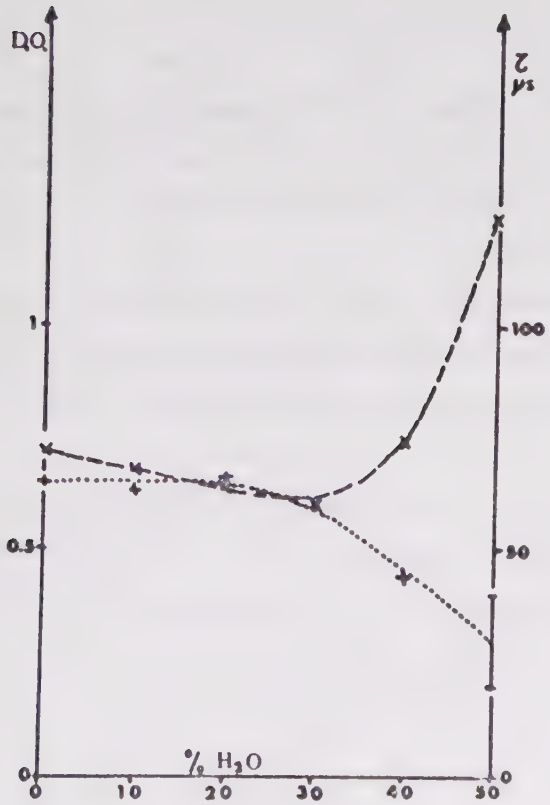
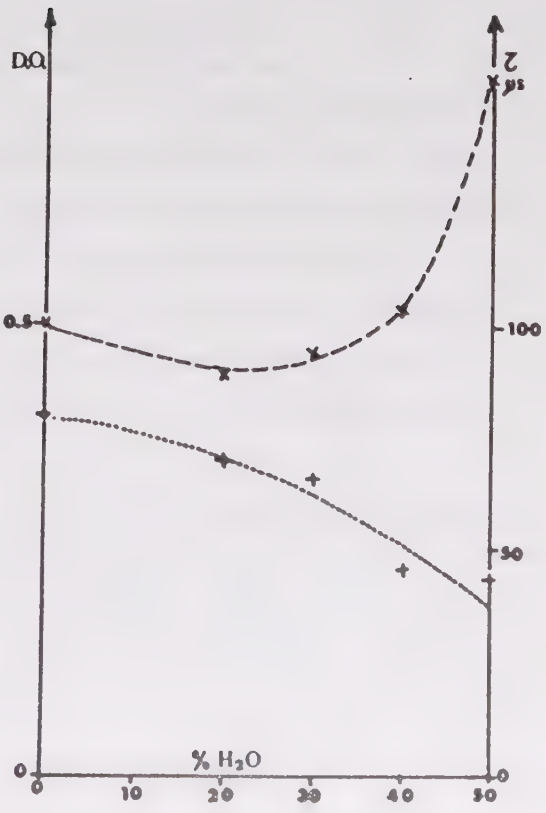


Fig. III.26. λ = 480 nm
C = 10^{-5} mole-l^{-1}



Alors que pour le triton X 100 l'état triplet est présent quelle que soit la teneur en eau, les mélanges pyridine eau et acétone eau présentent les 3 régions déjà trouvées dans les études précédentes.

région I à faible teneur en eau : présence d'un état triplet

région II intermédiaire : diminution du signal triplet accompagné d'une augmentation sensible du temps τ de demi retour à l'état singulet.

région III : disparition du signal triplet.

I.4. Etude par diffusion de la lumière

La diffusion de la lumière par un milieu homogène est fortement augmentée par la présence de particules dont les dimensions sont nettement supérieures à celles des molécules de solvant. Il est possible de relier théoriquement la masse molaire de telles particules aux caractéristiques de la diffusion ; l'étude des macromolécules et des polymères a beaucoup utilisé cette technique.

Des mesures ont été effectuées sur les solutions de chla dans les mélanges binaires (MEULLENET 1971). On constate effectivement une augmentation importante de la diffusion dans la zone II et, à un degré moindre, dans la zone III. Le tableau III.1 donne quelques exemples de masses molaires pour quelques solutions.

I.5. Discussion

Les quatre études précédentes permettent d'expliquer les comportements successifs de la chlorophylle en fonction de la teneur en eau des solutions. On peut constater que, pour tous les solvants sauf le triton X 100, le comportement général est le même :

- une zone I (jusqu'à 30 à 50 % d'eau), avec des propriétés spectroscopiques simples et variant peu par rapport au solvant organique pur, avec en particulier une émission de fluorescence importante, un état triplet et une faible diffusion ;
- une zone III (au-dessus de 50 à 70 % d'eau) caractérisée par des spectres d'absorption variant peu, mais essentiellement par l'absence de tout état triplet et de signal de fluorescence et la présence d'une diffusion relativement importante.

- une zone II intermédiaire, caractérisée par des propriétés spectroscopiques particulières, avec apparition de nouvelles bandes d'absorption et variation très rapide des signaux de fluorescence et d'état triplet. Cette zone se caractérise également pour une forte diffusion révélant la présence de "particules" de grande masse molaire.

Ces propriétés spectroscopiques permettent d'interpréter l'évolution du pigment, en particulier au niveau de son organisation dans les solutions.

La zone I s'explique à partir des données connues sur la solvatation de la chlorophylle. On sait en effet que de faibles quantités d'eau ou de substance polaire sont suffisantes pour qu'une ou deux molécules de ces substances se fixe sur le magnésium central de la molécule de pigment. Nous avons donc ici les propriétés de la chlorophylle solvatée et isolée, isolement traduit par des bandes d'absorption étroites et par des signaux de fluorescence et d'état triplet. Les légères variations que l'on observe, en particulier le déplacement des bandes d'absorption et de fluorescence, sont dues aux variations de la polarité du milieu (n et ε). On sait que ces variations du milieu conduisent à de très faibles déplacements.

La zone II, par les variations brutales des propriétés spectroscopiques, suggère une organisation nouvelle du pigment. En particulier, la disparition progressive de la fluorescence et des signaux triplet s'explique par une aggrégation de la chlorophylle. La simple dimérisation, proposée par LITVIN (LITVIN 1968), semble insuffisante. En effet, à l'élargissement des bandes qu'elle explique, il faut ajouter les nouvelles bandes d'absorption vers 750 nm qui rappellent celles du cristal. D'autre part, la diffusion de la lumière révèle la présence dans la solution d'agrégats correspondant à des degrés de polymérisation de plusieurs centaines. Il s'agit donc certainement de l'apparition de formes microcristallines qui d'ailleurs peuvent être centrifugées. Les variations dans la position et l'intensité de la bande à 750 nm peuvent être expliquées par les difficultés de germination des cristaux.

La constatation faite au sujet de la solution éthanolique à 60 % d'eau permet de remarquer que le quenching de fluorescence est antérieur à la formation des formes cristallines ou paracristallines. Cette formation n'est donc pas nécessaire pour passer de la zone I à la zone III, ce qui est

le cas par exemple pour le THF ou la pyridine. Cette remarque justifie aussi le fait que les solutions eau-pyridine présentent les 3 zones du point de vue fluorescence, donc les deux états de la chlorophylle, sans que cela se traduise par une discontinuité de la position du pic d'absorption rouge.

L'augmentation de la durée de vie de l'état triplet suggère qu'il existe dans la région II un équilibre entre les formes agrégées qui ne présentent pas d'état triplet et le pigment solvaté mais non structuré.

Soient en effet S et T les états singulet et triplet de la molécule solvatée ; les principales voies de désactivation de l'état triplet sont

$T \rightarrow S$ (1) désactivation non radiative

$T + T \rightarrow 2\,S$ ou $T + T \rightarrow T + S$ (2)

$T + S \rightarrow 2\,S$ (3)

$T + Q \rightarrow S + Q^*$ désactivation par intervention d'un quencher.

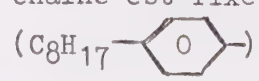
La vitesse de désactivation de l'état triplet est donc plus faible quand la concentration des espèces S et T diminue.

Dans la région III, nos résultats ne sont pas en accord avec ceux de LITVIN, car la bande a 720-750 nm a complètement disparu. Ceci peut être facilement expliqué par les différences de la préparation des solutions. Nous avons indiqué, en effet, que par dilution d'une solution de la zone II avec de l'eau, on ne pouvait pas solubiliser les microcristaux. La forme obtenue est probablement une forme agrégée mais de faible organisation, car le déplacement de la bande d'absorption est relativement petit.

Les mesures de diffusion montrent la présence d'agrégats contenant quelques dizaines de molécules de pigments. Ceci peut expliquer la disparition de la fluorescence et de l'état triplet dans cette région.

Il est intéressant de constater que le maximum de la bande rouge est toujours voisin de 670 nm, ce qui explique que dans la pyridine on n'obtient pratiquement pas de variation de la longueur d'onde du maximum. Nous interprétons ces résultats en admettant que l'agrégation se fait par interactions des parties hydrophobes de la molécule (phytol en particulier), conduisant à la formation de micelles, mettant en contact avec la solution, le magnésium solvaté par l'eau. Il est possible qu'il existe plusieurs types de micelles ce qui expliquerait les élargissements observés aux grandes concentrations en eau pour certains solvants (acétone en particulier).

Le cas particulier du triton X 100 montre bien l'importance des interactions hydrophiles-hydrophobes dans la formation des agrégats en solution. Le triton X 100, possède le même squelette hydrophile que le PEG 400, mais à une extrémité de la chaîne est fixé un groupe hydrophobe



Dans les solutions de chlorophylle dans les mélanges triton - eau, il n'y a pas de discontinuités et la variation de la longueur d'onde du maximum des bandes d'absorption de la chlorophylle est peu déplacée.

Le seul accident qui apparaisse est une diffusion importante au moment où le triton X 100 donne une phase mésomorphe qui rend les mesures très difficiles.

Mélange	Masse molaire	degré polymérisation
méthanol 60/eau 40	275 000	300
méthanol 40/eau 60	22 000	25
méthanol 25/eau 75	120 000	125
THF 40/eau 60	13 106	13 10^3
THF 25/eau 75	8 104	80
pyridine 20/eau 80	7 104	70
acétone 20/eau 80	4 104	40

Tableau III. 1.

HOCHAPFEL A., JOURNEAUX R., VIOVY R.	Jal Chim. Phys. 66 (1467)	1969
HOCHAPFEL A., JOURNEAUX R., VIOVY R.	Jal Chim. Phys. 66 (1474)	1969
LITVIN F.F.	Biofizica 12 (433)	1968
LOVE B.B.	Biochem. Bioph. Acta 12 (318)	1962
MEULLENET J. P.	Mémoire D.E.A.	1971
VERNON L. P., SEELY G. R.	In chlorophyll Acad. Press.	1966

II. ETUDE DANS LES MILIEUX APOLAIRES.

Dans les solvants apolaires très purs, les propriétés spectroscopiques de la chlorophylle sont très perturbées. Les spectres d'absorption révèlent la présence d'épaulements, en particulier au niveau de la bande rouge (vers 700 nm). De plus, la fluorescence est fortement diminuée et même supprimée (LAVOREL 1957, LIVINGSTON 1960). Les deux perturbations sont supprimées par addition d'une faible quantité de substance polaire.

Plusieurs études ont prouvé que la chlorophylle forme des solvates fluorescents dans les solvants du type basique (FREED et SANCIER 1959). L'absence de substance basique dans les solvants apolaires très purs a conduit à penser que la chlorophylle s'organise alors en dimères ou oligomères plus complexes et non fluorescents ; ces complexes peuvent être détruits par une substance basique pour redonner le monosolvate classique. Des études en spectroscopie I.R. (KATZ et al. 1963, ANDERSON-CALVIN 1964), visible (SHIPMAN et al 1976), en R.M.N. (KATZ et al. 1968), par mesure de masses molaires (BALLSCHMITTER et al. 1969) prouvent que l'atome de magnésium central et l'oxygène cétonique du cycle pentanone de deux ou plusieurs molécules forment des liaisons du type donneur - accepteur pour donner des dimères ou des oligomères, avec prédominance de la forme dimère aux faibles concentrations (10^{-5} mole/litre). La constante de dimérisation a été étudiée quantitativement pour la chlorophylle b (AMSTER et PORTER 1967), et les caractéristiques thermodynamiques de l'équilibre ont été déterminées pour la pyrochlorophylle (LEICHNAM et al. 1978).

Dans cette étude, nous avons postulé l'existence d'un équilibre entre le dimère D, le monosolvate MS et une substance polaire S

$2S + D \rightleftharpoons 2\,MS$

caractérisé par la constante d'équilibre $K = \dfrac{(MS)^2}{(S)^2(D)}$

II.1. Préparation des solutions

L'étude de la chlorophylle dans les solvants apolaires nécessite des conditions expérimentales particulières. Les produits doivent être exempts de substance polaire, et la préparation des solutions doit se faire en atmosphère sèche, les équilibres étudiés étant très sensibles à la présence de l'eau.

Les solvants apolaires utilisés (heptane, cyclohexane, benzène) sont purifiés par distillation cyclique continue. Le dessséchant utilisé est CaH_2, et le produit est finalement recueilli et stocké sur tamis moléculaire.

Le pigment est également séché avant dissolution. Pour cela, il est soumis pendant plusieurs heures à un vide secondaire de 10^{-5} à 10^{-6} Torr. La solution est réalisée dans une boîte à gants contenant un dessséchant et parcourue par un courant d'azote. Les accessoires (pipettes, cuves) sont portées à l'étuve avant la préparation de la solution. Les additions successives de substance polaire se font dans une boîte à gants différente pour éviter la contamination du solvant pur.

II.2. Etude théorique

Le spectre d'absorption d'une molécule est modifié quand elle est insérée dans une structure régulière (polymère de N éléments).

En admettant entre les molécules une interaction du type dipôle dipôle, il est possible de calculer les modifications apportées aux niveaux excités, et d'en déduire les modifications du spectre d'absorption (Mc RAE et KASHA 1958, 1964). Dans le cas particulier du dimère, un état excité π^* correspondant à un moment de transition dans la plan de la molécule se dédouble en deux niveaux. L'écart entre ces niveaux, l'intensité des deux bandes d'absorption correspondantes et les règles de sélection dépendent de l'arrangement géométrique du dimère. L'existence de deux bandes est compatible avec deux dispositions géométriques différentes (Fig. III.27)

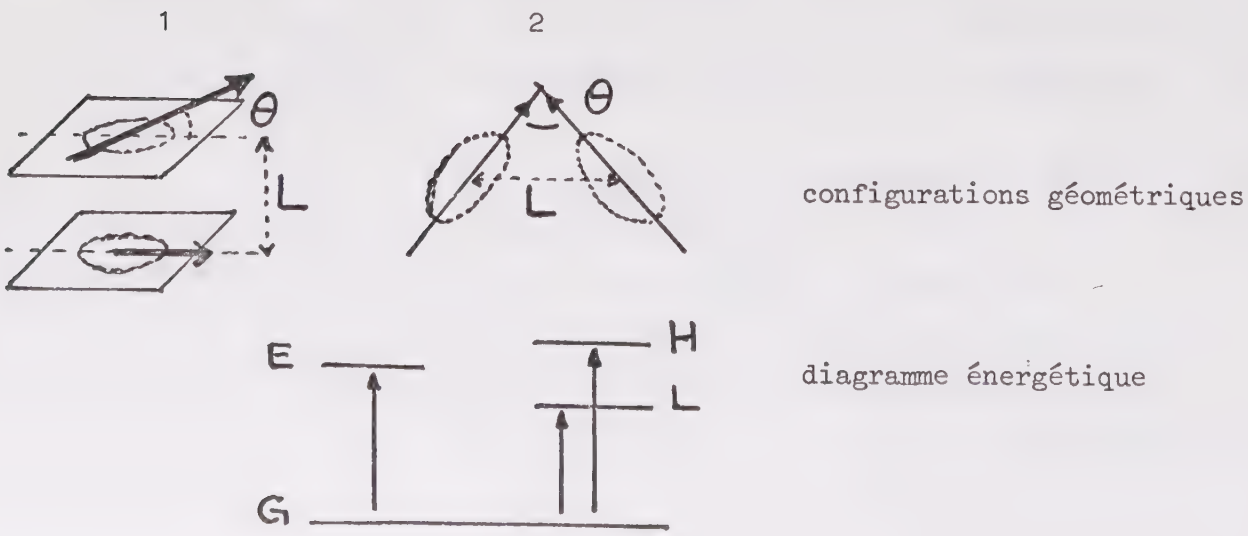


Figure III. 27.

Les calculs, dans les deux configurations, permettent de relier θ et L aux caractéristiques du spectre d'absorption. Soient ε_L et ε_H les coefficients d'extinction des deux bandes correspondant aux deux niveaux H et L, $\Delta\nu$ leur écart de fréquence, ν_o la position de la bande du monomère isolé, D le moment de transition dipolaire pour le monomère. On démontre que (voir appendice)

$$\theta = 2 \text{ Arc tg} \sqrt{\frac{\varepsilon_L}{\varepsilon_H}} \qquad (1)$$

$$\Delta\nu = \frac{D^2(3 - \cos\theta)}{hc\ L^3} \quad \text{soit} \quad L^3 = \frac{D^2(3 - \cos\theta)}{hc\ \Delta\nu}$$

type 2 $\quad \Delta\nu = \dfrac{2\ D^2 \cos\theta}{hc\ L^3} \quad$ soit $\quad L^3 = \dfrac{2\ D^2 \cos\theta}{hc\ \Delta\nu}$

Le moment D peut être déterminé à partir de la force de l'oscillateur f pour la transition du monomère

$$D^2 = \frac{3\ h\ e^2}{8\pi^2\ mc} \quad \frac{f}{\nu_o} \qquad f \text{ force de l'oscillateur}$$

$$\text{avec } f = 10^3 \text{ Ln } 10 \ \frac{mc^2}{\pi e^2 N} \int_{\text{bande}} \varepsilon(\nu)\ d\nu$$

Les énergies étant exprimées en cm^{-1} et les autres unités prises dans le système UES.CGS les expressions deviennent :

$$f = 4{,}319\ 10^{-9} \int \varepsilon(\nu)\ d\nu$$

$$D^2 = 2{,}123\ 10^{-30}\ \frac{f}{\nu_o}$$

La détermination de f nécessite la connaissance de $\int \varepsilon\ (\nu)\ d\nu$ qui représente l'aire limitée par la courbe d'absorption. On peut l'obtenir par planimétrie. Un moyen plus rapide de l'obtenir consiste à représenter cette bande d'absorption par une fonction gaussienne du type

$$\varepsilon(\nu) = \varepsilon_o \exp\left[- \text{Log } 2 \left(\frac{\nu - \nu_o}{\delta}\right)^2\right]$$

δ représente alors la largeur en fréquence à mi-hauteur.

On peut alors écrire $\int \varepsilon(\nu)\ d\nu = \varepsilon_o\ \delta \sqrt{\dfrac{\pi}{\text{Log}2}}$

Les formules ci-dessus deviennent alors

$$f = 9{,}195\ 10^{-9}\ \delta\varepsilon_o \quad \text{et} \quad D^2 = 1{,}952\ 10^{-38}\ \frac{\delta\varepsilon o}{\nu o}$$

La longueur L peut être alors déterminée par la relation

$$L^3 = 9{,}829\ 10^{-23}\ \frac{\delta\varepsilon o}{\nu_o\ \Delta\nu}\ (3 - \cos\theta)$$

$$\text{soit } L = 4{,}616\ \sqrt[3]{\frac{\delta.\ \varepsilon o}{\nu_o\ \Delta\nu}\ (3 - \cos\theta)} \qquad \text{en } \mathring{A} \qquad (2)$$

$$\text{ou } L = 4{,}616\ \sqrt[3]{\frac{\delta\ \epsilon_o}{\nu_o\ \Delta\ \nu}\ 2\cos\theta}$$

II.3. Recherche du nombre d'espèces

II.3.1. Principes

La détermination du nombre d'espèces présentes dans une série de solutions peut se faire par diverses méthodes (LANE et al. 1976, COLEMAN et al. 1970). La plus simple consiste à chercher des relations linéaires indépendantes entre des grandeurs caractérisant les solutions. L'absorption de la lumière peut être une de ces grandeurs.

Soit une série de solution contenant n espèces ayant des spectres différents. A une longueur d'onde λj, l'absorption A d'un mélange est une fonction linéaire des concentrations Ci des n espèces

$$A = \sum_{i=1}^{n} \varepsilon ij\ \ Ci$$

εij absorption spécifique de l'espèce i à la longueur d'onde λj.

Cela signifie qu'il faut n mesures à n longueurs d'onde pour en déduire Ci connaissant εij pour chaque espèce. Il existe donc n relations indépendantes de la forme

$$Aj = \sum_{i=1}^{n} \varepsilon ij\ Ci \qquad (j = 1, n)$$

soit en notation matricielle

$$|A| = |\varepsilon|\ |C|$$

ou

$$|C| = |\varepsilon|^{-1}\ |A| \qquad (3)$$

L'absorption à une longueur d'onde λ_{n+1} pourra s'exprimer de la même façon soit

$$A_{n+1} = \sum_{i=1}^{n} \varepsilon i,\ n+1\ Ci$$

soit en utilisant (3)

$$A_{n+1} = \sum_{i=1}^{n} \alpha i\ A_i \quad (4)$$

α_i ne dépend que des coefficients ε_{ij} $(i = 1, n \quad j = 1, n+1)$

Soit une série de mesures sur p mélanges possibles de n espèces absorbantes à q longueur d'onde. On peut trouver à partir du tableau p x q (si $p \geqslant n$ et $q \geqslant n+1$) les n termes αi de la relation (4) en utilisant n+1 longueurs d'onde et n mélanges. Si $p \gg n$, plusieurs ensembles αi peuvent être obtenus aux mêmes n+1 longueurs d'onde mais pour des groupes de mélanges différents. Ces ensembles doivent être identiques aux erreurs expérimentales près puisque αi ne dépend que de εij.

Si le nombre d'espèces est inconnu, on fait le test en supposant n=1, 2, etc... Le nombre d'espèces est le nombre minimum tel que les ensembles αi soient identiques pour différents groupes de mélanges, ceci aux erreurs expérimentales près.

Une autre méthode consiste à remarquer que le nombre d'espèces indépendantes est égal au rang de la matrice A_{ij} formée par les absorptions des solutions j aux longueurs d'onde λ_i. Le rang de la matrice sera n si les déterminants extraits de la matrice sont nuls à partir du rang n + 1. A partir du tableau p x q évoqué ci-dessus, il faut donc calculer les déterminants de rang n et chercher le rang minimum qui les rend tous nuls.

En réalité, les éléments de la matrice sont déterminés avec une certaine incertitude ; les déterminants qui en sont extraits ne peuvent donc être nuls au sens mathématique du terme. Pour qu'un déterminant soit considéré comme nul, il faut que sa valeur obéisse à certaines conditions fournies par une méthode statistique. Plusieurs méthodes ont été discutées (KANKARE 1970, WALLACE 1960, WALLACE et KATZ 1964, KATAKIS 1965)

La plus simple consiste à calculer la quantité

$$d = \frac{|A|}{\left[\sum_{i,j} (\Delta_{ij})^2\right]^{1/2}} = \frac{|A|}{\zeta}$$

$|A|$ est le déterminant calculé.

Δ_{ij} est le cofacteur du terme A_{ij} dans ce même déterminant. Si les coefficients A_{ij} sont déterminés avec la même incertitude σ, le déterminant $|A|$ pourra être considéré comme nul si $d < \sigma$

II.3.2. Exemples

Le tableau III.2. donne pour diverses longueurs d'onde, les densités optiques de plusieurs solutions contenant les formes monomères et agrégées de chl a dans le cyclohexane.

a) Recherche de relations linéaires $A_{n+1} = \sum_{i=1}^{n} \alpha_i A_i$

n = 1 On recherche dans le tableau des relations de la forme $A_2 = \alpha_1 A_1$ en utilisant un mélange et deux longueurs d'ondes. Le tableau III.3. donne quelques exemples tirés du tableau III.2.

Mélange k / λ nm	1	2	3	4	5	6	7
660	0,498	0,503	0,498	0,502	0,578	0,60	0,612
662,5	0,547	0,55	0,547	0,548	0,631	0,658	0,668
665	0,55	0,553	0,545	0,538	0,605	0,626	0,634
667,5	0,523	0,515	0,50	0,498	0,52	0,525	0,525
670	0,48	0,465	0,442	0,422	0,412	0,398	0,395
672,5	0,44	0,418	0,392	0,37	0,313	0,297	0,274
675	0,41	0,382	0,35	0,325	0,245	0,208	0,19
677,7	0,374	0,347	0,315	0,29	0,198	0,156	0,133
680	0,328	0,30	0,271	0,245	0,158	0,112	0,098

Tableau III.2. Valeurs de Aij pour diverses solutions de Chla dans le cyclohexane.

On peut constater que :

- pour certains couples de longueurs d'onde (660 - 662,5 nm), les valeurs α, sont voisines $\alpha_1 = 1,095 \pm 0,003$
- pour d'autres couples, les valeurs α, sont très dispersées.

On peut en conclure qu'il y a plus d'une espèce dans les milieux, la constante de α, dans certains cas signifie que pour ces longueurs d'onde les spectres des différentes espèces sont les mêmes (à une constante multiplicatrice près).

n = 2 On recherche des relations de la forme $A_3 = \alpha_1 A_1 + \alpha_2 A_2$ en utilisant deux solutions et trois longueurs d'onde.
Le tableau III.4. donne quelques exemples tirés du tableau III.2.
On peut constater que :

- pour des longueurs d'onde de la région 660 - 665 nm les valeurs α_1 et α_2 sont très dispersées. Dans cette région en effet, le cas n = 1 a montré qu'une seule espèce pouvait décrire la solution. Dans ces conditions les déterminants de rang 2 sont nuls et α_1 et α_2 prennent une forme indéterminée 0/0
- pour des groupes de longueurs d'onde plus dispersées, les valeurs α_1 et α_2 sont bien constantes avec un écart type lié aux incertitudes expérimentales. En particulier on peut constater que le couplage de deux solutions voisines, de compositions peu différentes, donnent les valeurs de α qui s'écartent le plus de la moyenne.

b) Recherche à partir des déterminants

On peut extraire du tableau III.2. les divers déterminants de rang 2, 3 etc...

- déterminants de rang 2

Dans le domaine de longueurs d'onde 660 - 665 nm, on trouve des valeurs de A de l'ordre de $10^{-3} - 10^{-4}$, alors que dans le cas de longueurs d'onde plus dispersées, A varie dans le domaine $10^{-1} - 10^{-2}$.

- déterminants de rang 3

Tous les déterminants de rang 3 sont inférieurs à 10^{-2}.

Mélange k / λ_1 nm	λ_2	1	2	3	4	5	6	7
660	662,5	1,099	1,093	1,099	1,092	1,092	1,096	1,092
660	675	1,21	1,32	1,42	1,69	2,36	2,88	3,22
660	680	1,52	1,68	1,84	2,05	3,66	5,36	6,24
670	680	1,46	1,55	1,63	1,72	2,61	3,55	4,03

Tableau III.3. Coefficients α d'une relation linéaire pour n = 1.

λ = 660 662,5 665 nm.

k_1 \ k_2	3	4	5	6
1		1,15 -0,24	1,03 -0,12	
2	0,46 0,45		0,95 -0,031	
3			1,06 -0,15	
4				0,78 0,14

λ = 660 667,5 677,nm

k_1 \ k_2	2	3	4	5	6	7
1	1,38 -0,59	1,32 -0,51	1,40 -0,63	1,29 -0,48	1,27 -0,45	1,28 -0,46
2		1,27 -0,44	1,42 -0,65	1,29 -0,46	1,27 -0,43	1,28 -0,45
3			1,57 -0,91	1,29 -0,46	1,27 -0,43	1,28 -0,45
4				1,26 -0,39	1,25 -0,38	1,27 -0,40
5					1,25 -0,35	1,27 -0,43
6						1,32 -0,6

Tableau III.4. Couples de coefficients α d'une relation linéaire pour n = 2.

Application du critère de nullité.

On peut admettre que les densités optiques sont connues avec une incertitude absolue de $5\ 10^{-3}$ (incertitudes de lectures et incertitudes dues à la ligne de base).

- déterminants de rang 2

On peut prendre comme exemple le déterminant

0,547	0,547
0,374	0,315

$|A| = 3{,}2\ 10^{-2}$ $\quad \zeta = 0{,}9$ $\quad d = 3{,}5\ 10^{-2}$

On a bien $d > \sigma$

D'autres exemples donnent des résultats analogues.

- déterminants de rang 3

On peut prendre comme exemple le déterminant

0,547	0,547	0,631
0,48	0,442	0,412
0,374	0,315	0,198

$|A| = 3\ 10^{-4}$ $\quad \zeta = 0{,}2$ $\quad d = 1{,}5\ 10^{-3}$

On a bien $d < \sigma$

D'autres exemples montrent que les déterminants de rang 3 peuvent être considérés comme nuls.

On peut en conclure qu'il est légitime de postuler, compte tenu des incertitudes expérimentales, que deux espèces seulement sont nécessaires pour décrire les solutions étudiées, à savoir le monomère solvaté et le dimère du pigment.

II.4. Etude par fluorescence et absorption

Nous avons retenu comme hypothèse l'absence de fluorescence du dimère, hypothèse en accord avec des résultats antérieurs (LIVINGSTON et al. 1949) ou des considérations théoriques (Mc RAE, KASHA 1958). Dans ces conditions, l'intensité de fluorescence est en relation avec la quantité de monomère, seule espèce fluorescente. Les expériences ont été faites dans une cuve carrée (10 mm de côté) avec observation classique à 90°. Le volume "utile" est alors une partie seulement de la solution concentrée de la cuve (fig. III 28).

Les convergences du faisceau d'excitation et du faisceau d'analyse étant faibles, ce volume sera assimilé à un parallélépipède dont les côtés h_1 et h_2 sont les dimentions de la fente de sortie du monochromateur d'excitation d'une part et de la fente d'entrée du monochromateur d'analyse d'autre part. Des corrections sont alors nécessaires pour tenir compte de l'absorption de la lumière d'excitation et de la réabsorption de la lumière de fluorescence.

D'autre part, nous avons négligé le phénomène de fluorescence secondaire. Les corrections restent faibles aux concentrations utilisées (10^{-5} mole/l) et ne sont simples à effectuer que dans le cas de géométrie de révolution du système d'analyse et d'excitation. Les résultats de SZALAY et al. (SZALAY et al. 1967) font apparaître que l'intensité absolue de fluorescence subit une modification de 2 % environ pour une solution de concentration 10^{-5} mole/l et pour une épaisseur de solution de 1 mm.

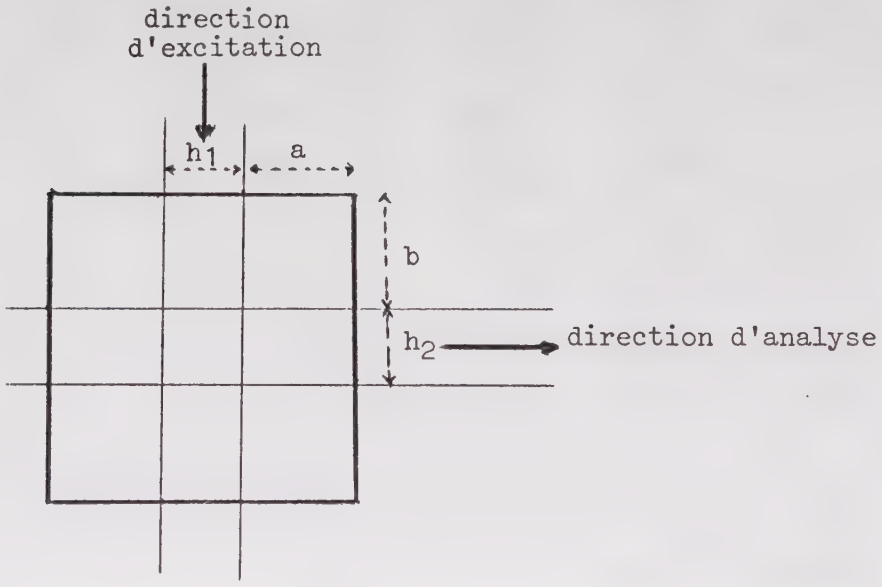


Figure III. 28

L'intensité de fluorescence effectivement détectée s'exprime par la relation

$$F = K.F_c.D_m \qquad (5)$$

avec

$$F_c = \frac{1}{De\ Da}\ 10^{-\frac{b}{L}De - \frac{a}{L}Da}\ (1 - 10^{-\frac{h_2}{L}De})\ (1 - 10^{-\frac{h_1}{L}Da})$$

- D_m représente la densité optique de la substance fluorescente présente dans la solution à la longueur d'onde d'excitation λ_e, c'est-à-dire le mo-

nomère solvaté. D_m peut donc être calculé par la relation (5) ; on en déduit les concentrations du monomère et du dimère dans la solution étudiée.

- F_c est un facteur qui peut se calculer pour chaque solution à partir des spectres d'absorption. D_e et D_a représentent les densités optiques de la solutions aux longueurs d'onde d'excitation λ_e et d'analyse λ_a respectivement ; a, b, h_1, h_2, L sont les paramètres géométriques définis par la figure III.28.

- K est une constante d'appareil qui dépend de la source d'excitation, du dispositif d'analyse, et également du rendement de fluorescence de la substance active pour le couple $\lambda_e\lambda_a$. Pour chaque couple ($\lambda_e\lambda_a$) il est possible de maintenir K constant pour une série d'expériences. Elle pourra alors être déterminée avec une solution dans laquelle la substance fluorescente est seule présente. Ceci est réalisé avec une solution dans laquelle la substance solvatante S étant en excès, l'équilibre est complètement déplacé et le pigment se trouve sous la seule forme du monomère solvaté.

Résultats expérimentaux

Les figures III.29 et III.30 donnent des exemples de spectres d'absorption et de fluorescence. La solution de départ est réalisée dans un solvant apolaire le plus pur possible ; les autres sont obtenus par additions successives de substance polaire S. Les tableaux III.5 et III.6 donnent les valeurs de D_d et D_m (densités optiques pour le dimère et pour le monomère) ainsi que la concentration (MS) pour différentes longueurs d'onde. Les figures III.29 et III.30 montrent quelques exemples de spectres de dimère obtenus ci-dessus. On peut tirer deux conclusions de ces résultats :

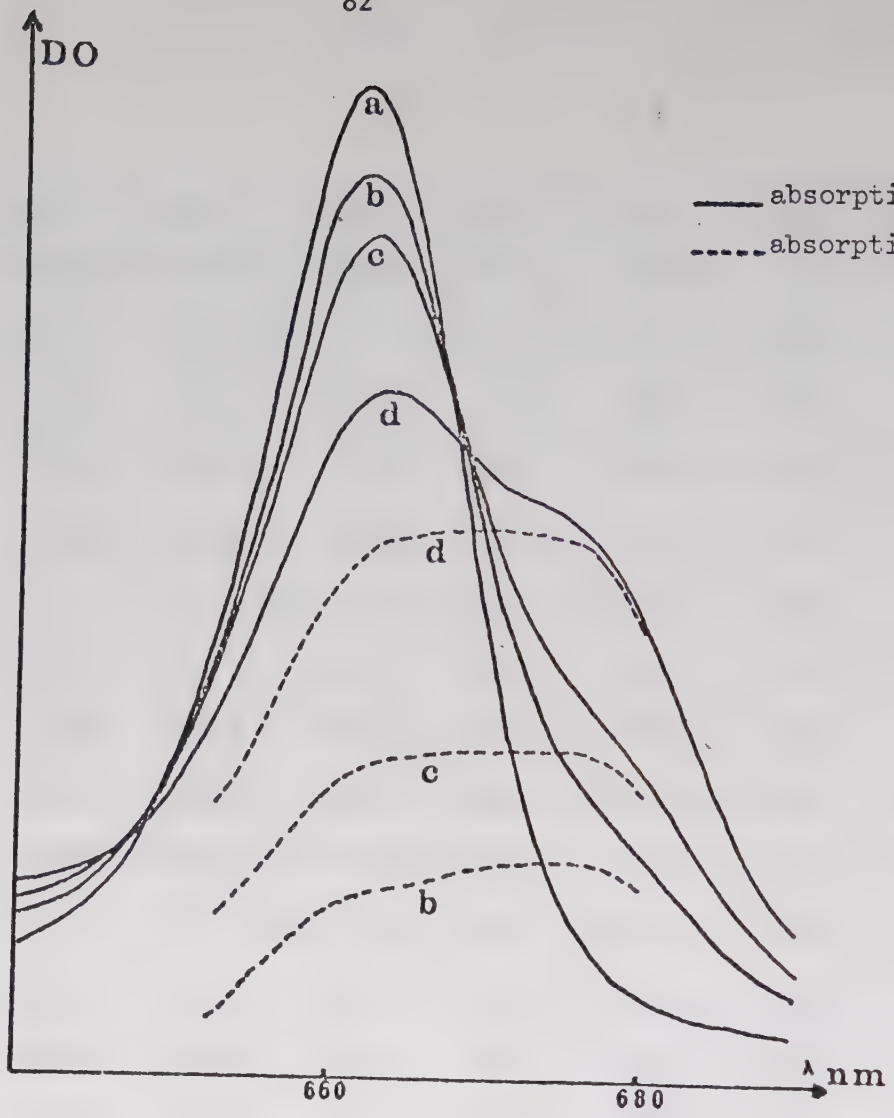
a) la concentration (MS), pour une solution donnée, est sensiblement constante, en particulier au niveau du maximum d'absorption. Ceci prouve, aux erreurs expérimentales près, qui sont relativement importantes (en particulier pour les mesures de fluorescence : étalonnage, bruit de fond), que l'hypothèse selon laquelle le monomère est la seule espèce fluorescente est légitime.

λ nm	675	672,5	670	667,5	665	662,5	660	657,5
Dm	0,119	0,146	0,166	0,18	0,182	0,173	0,147	0,117
Dd	0,417	0,444	0,474	0,48	0,459	0,412	0,350	0,287
$(MS)10^{+5}$	0,275	0,269	0,257	0,256	0,259	0,268	0,274	0,280
	$(\overline{MS}) = (0,267 \pm 0,01)\ 10^{-5}$ mole. l^{-1}							
Dm	0,24	0,284	0,337	0,37	0,368	0,342	0,284	0,223
Dd	0,269	0,299	0,33	0,338	0,328	0,288	0,246	0,205
$(MS)10^{5}$	0,554	0,54	0,523	0,525	0,522	0,53	0,53	0,53
	$(\overline{MS}) = (0,532 \pm 0,01)\ 10^{-5}$ mole. l^{-1}							
Dm	0,35	0,436	0,511	0,561	0,558	0,518	0,432	0,335
Dd	0,126	0,147	0,166	0,171	0,172	0,154	0,127	0,109
$(MS)10^{5}$	0,808	0,801	0,792	0,795	0,792	0,803	0,805	0,798
	$(\overline{MS}) = (0,799 \pm 0,06)\ 10^{-5}$ mole. l^{-1}							

Tableau III.5. Séparation monomère - dimère par étude couplée des spectres d'absorption et de fluorescence (Chla dans le benzène).

λnm	670	667,5	665	662,5	660	657,5	655	652,5
Dm	0,05	0,087	0,124	0,135	0,129	0,113	0,08	0,064
Dd	0,471	0,468	0,461	0,45	0,411	0,352	0,29	0,236
$(MS)10^5$	0,142	0,157	0,169	0,166	0,166	0,177	0,189	0,190
	$(MS) = (0,169 \pm 0,016)\ 10^{-5}$ mole. l^{-1}							
Dm	0,193	0,305	0,418	0,462	0,347	0,37	0,277	0,196
Dd	0,282	0,280	0,262	0,263	0,245	0,207	0,178	0,154
$(MS)10^5$	0,536	0,552	0,573	0,567	0,563	0,583	0,584	0,582
	$(MS) = (0,567 \pm 0,017)\ 10^{-5}$ mole. l^{-1}							
Dm	0,259	0,41	0,55	0,618	0,603	0,495	0,375	0,263
Dd	0,188	0,175	0,157	0,152	0,147	0,12	0,105	0,097
$(MS)10^5$	0,72	0,741	0,753	0,758	0,779	0,779	0,789	0,78
	$(MS) = (0,762 \pm 0,024)\ 10^{-5}$ mole. l^{-1}							

Tableau III.6. Séparation monomère - dimère par étude couplée des spectres d'absorption et de fluorescence (Chla dans l'heptane).



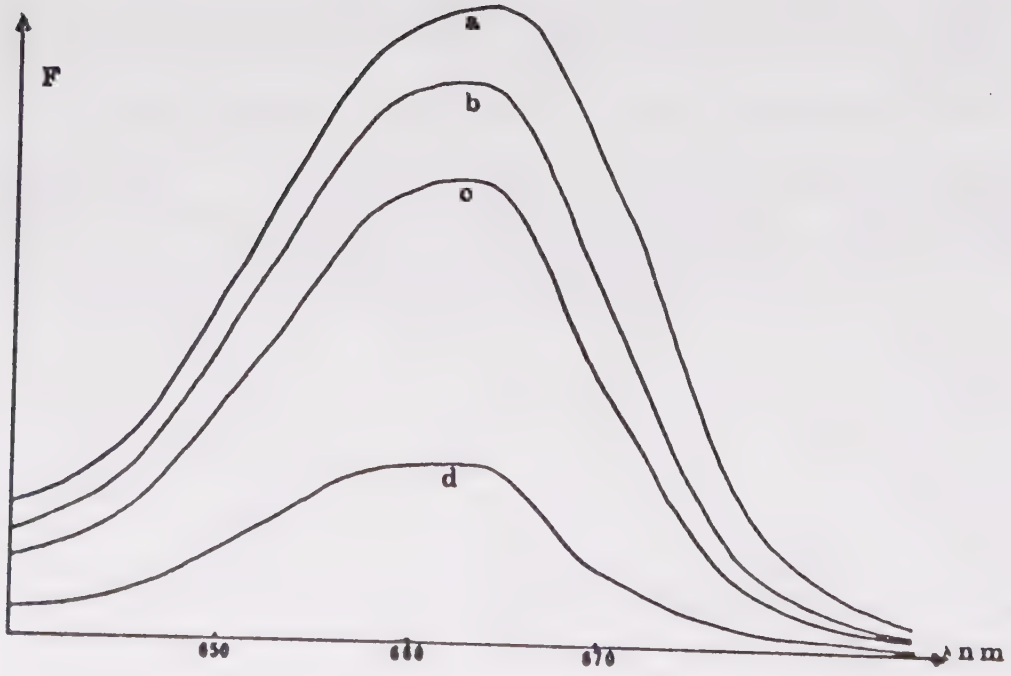


Fig. III. 29 - Evolution des spectres d'absorption et de fluorescence pour Chla dans l'heptane (Voir tableau III.8)

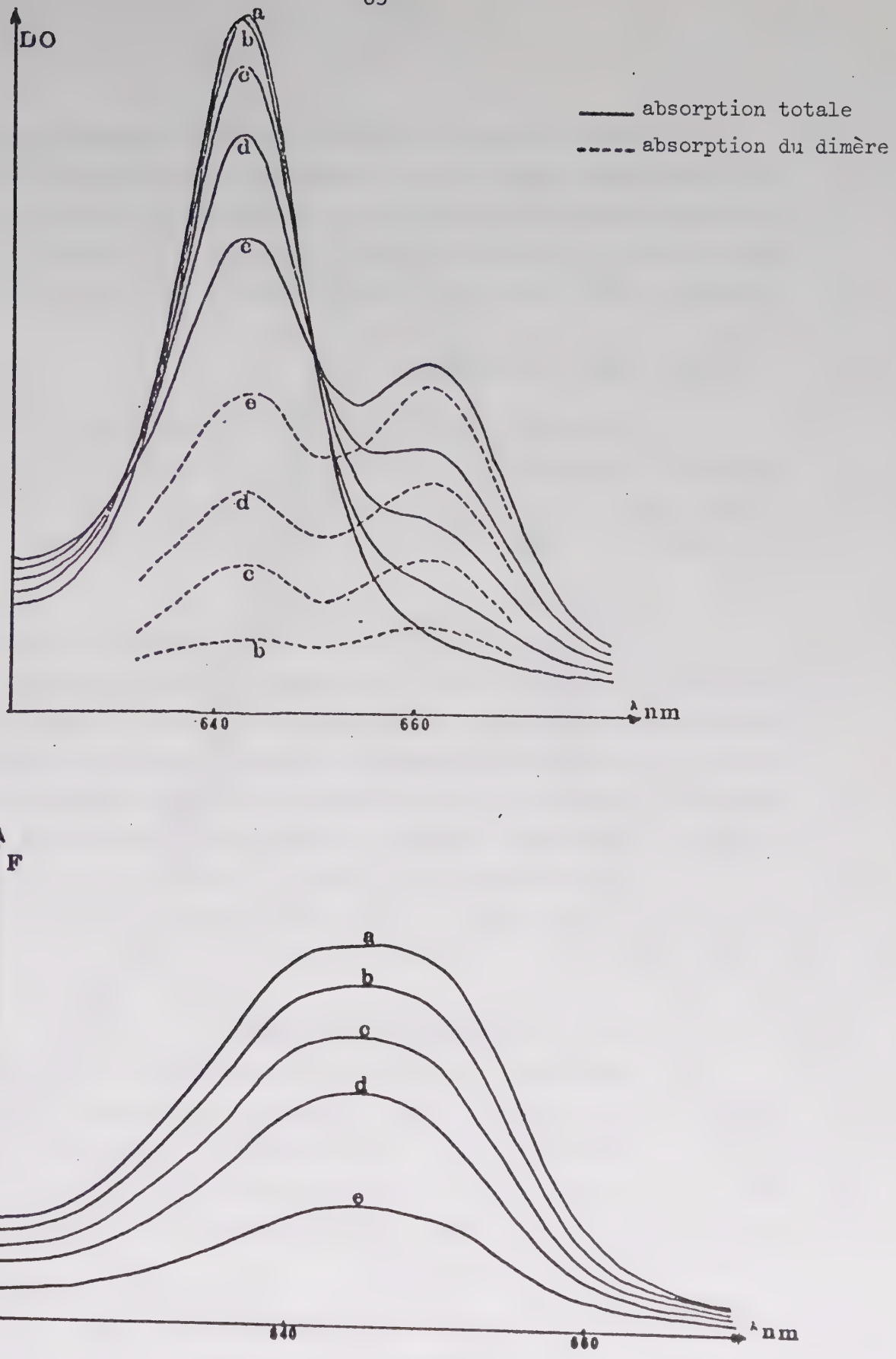


Fig. III. 30 - Evolution des spectres d'absorption et de fluorescence pour Chl b dans le cyclohexane (Voir tableau III. 7)

b) la courbe donnant D_d en fonction de λ se présente sensiblement comme une courbe symétrique ; ceci est compatible avec l'hyptohèse selon laquelle le spectre d'absorption du dimère se présente sous la forme de deux bandes de même intensité. Cette conclusion est en accord avec les résultats de AMSTER (AMSTER et PORTER 1967) pour la chlorophylle b dans le cyclohexane.

II.5. Etude par absorption

L'hypothèse précédente du dimère étant retenue, l'étude des seuls spectres d'absorption permet de déterminer sans ambiguité la composition de chaque solution. Cette méthode a pour avantage de s'affranchir des mesures de fluorescence, moins précises que les mesures en absorption.

II.5.1. * Principe de la méthode

A la longueur d'onde λ_i soient D_i la densité optique d'une solution et D_{oi} la densité optique de la même solution avec excès de S ; cette dernière ne contient que la forme monomère solvaté, de concentration C_o connue. Il existe alors un paramètre P tel que le spectre de différence $D_i - P \times D_{oi}$ conduit à deux bandes d'égale intensité. Pour chaque solution contenant l'équilibre D, MS et S on cherche par approximations successives le paramètre P.

La connaissance de P permet d'en déduire la concentration (MS) = $P.C_o$, donc la concentration (D) par différence avec la concentration totale en chlorophylle.

II.5.2. * Résultats expérimentaux

Les figures III.29 à III.31 représentent l'évolution de la bande rouge pour différents solvants et substances solvatantes.

Nous avons repris dans l'heptane et la pyridine une étude identique avec la phéophytine. On n'observe aucune évolution du spectre, en particulier au niveau de la bande rouge. Ceci montre le rôle essentiel du magnésium pour la formation du dimère.

Les figures III.32 à III.34 donnent quelques exemples de séparation des spectres monomères - dimères. Les tableaux III.7 à III.9 donnent pour ces mêmes exemples les valeurs des paramètres P et les concentrations (MS) et (D) dans chaque solution.

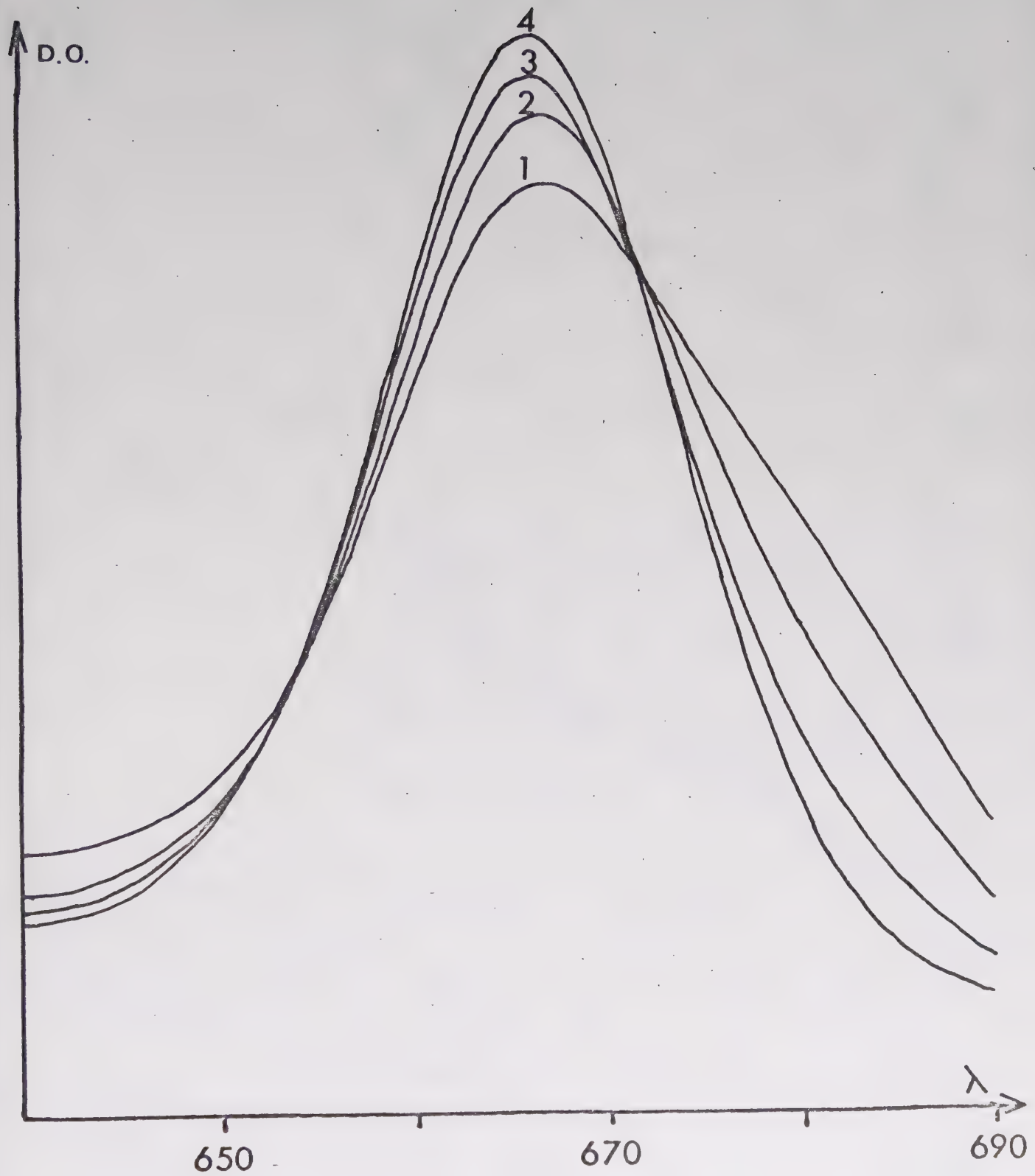


Fig. III. 31 - Evolution du spectre d'absorption pour Chl a dans le benzène
(Voir tableau III. 9)

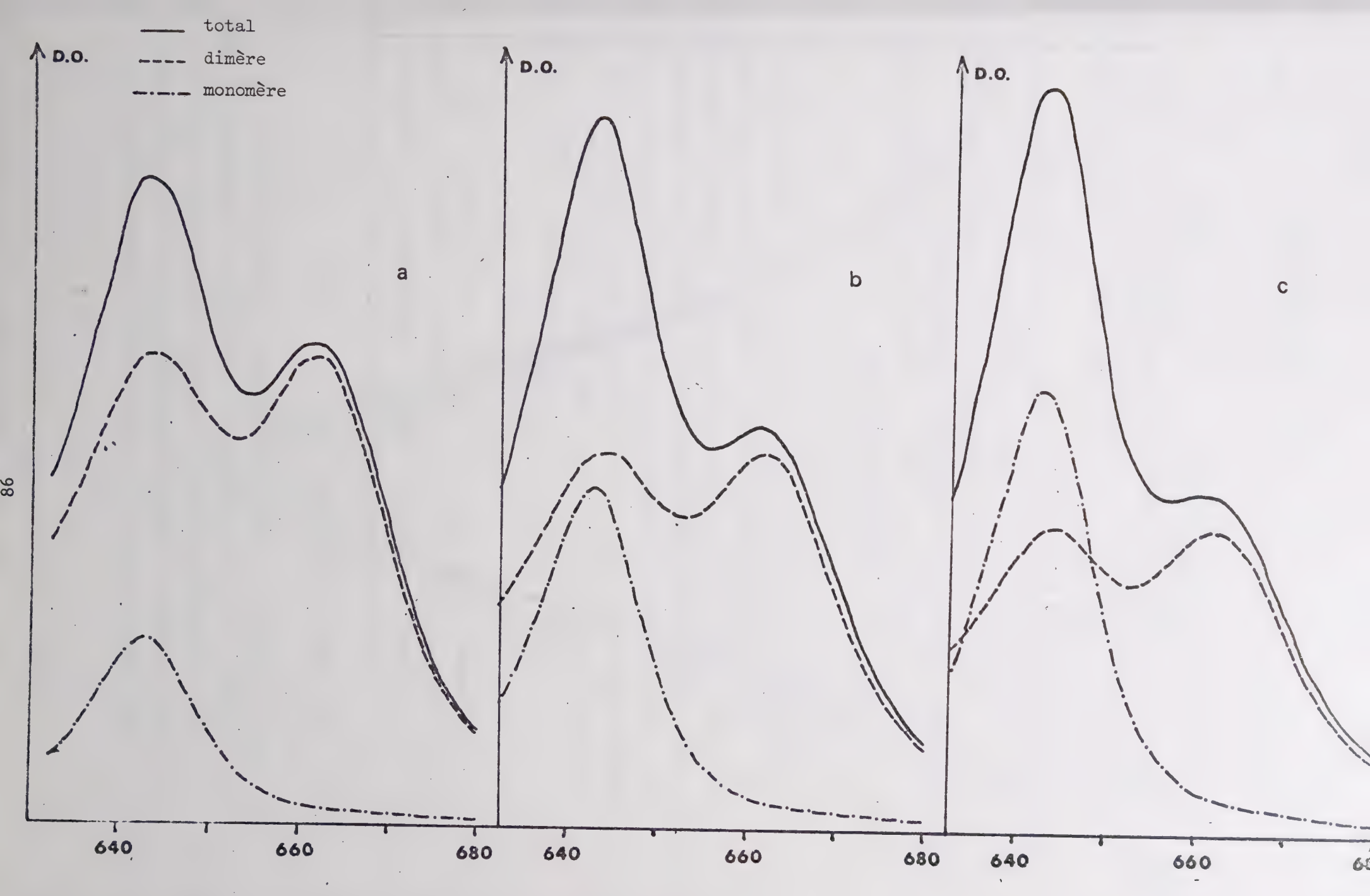
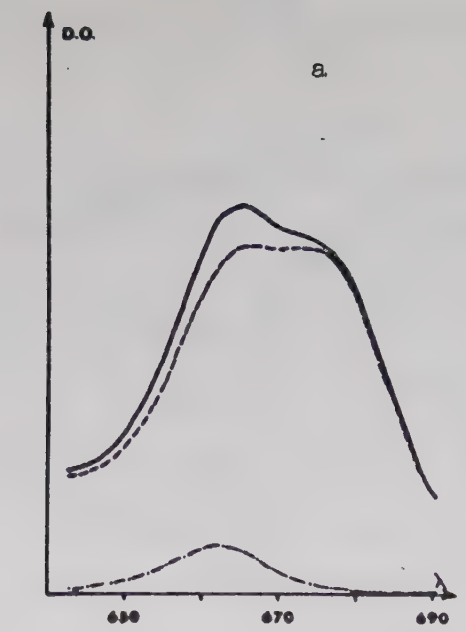


Fig. III. 32 - Séparation monomère dimère pour Chl b dans cyclohexane



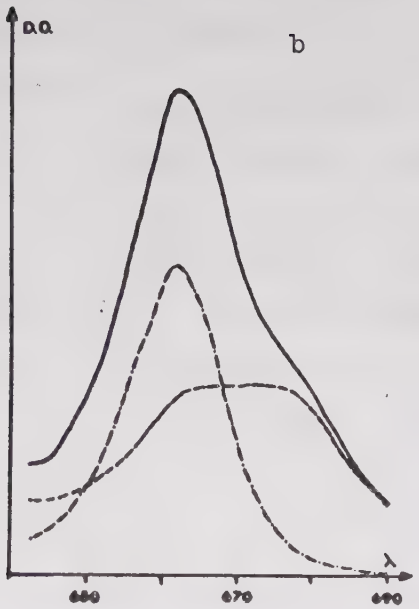
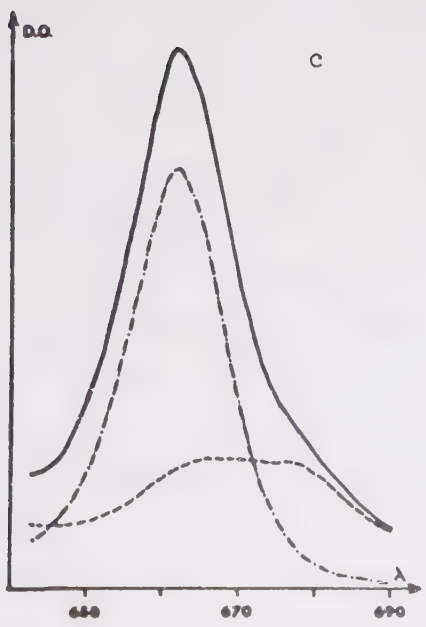


Fig. III. 33 - Séparation monomère dimère pour Chl a dans l'heptane

——— total
- - - - - dimère
—.—.—.— monomère



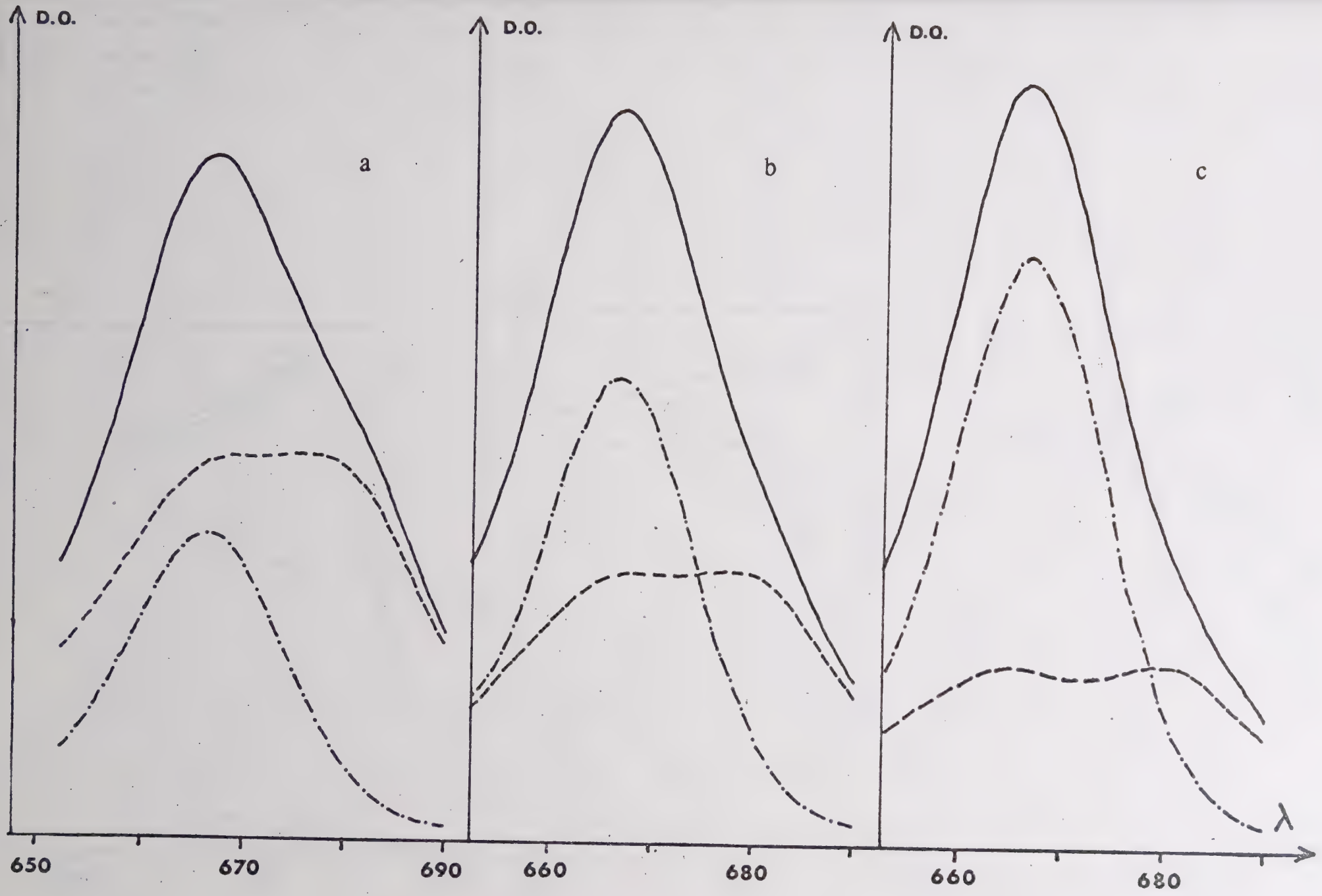


Fig. III. 34. Séparation monomère-dimère pour Chl a dans le benzène

Expérience	x	y	z	P	(MS) x 10^{-6}	(D) x 10^{-6}
1	0	0	0	0,23	4,4	10
2	0	0	0,1	0,425	8,1	7,75
3	0	0	0,2	0,56	10,6	6,1
4	0	0	0,4	0,725	13,8	3,9
5	0	0,2	0,4	0,956	18	1,23
6	0,2	0,4	0,4	1	19	0

Tableau III.7. Equilibre monomère dimère pour la chlorophylle b dans le cyclohexane. Substance solvatante : pyridine.

Concentration totale initiale en chlorophylle = $2,44.10^{-5}$ mole.l^{-1}, volume initial = 3 cm^3.
x, y, z = additions (en cm^3) de solutions de pyridine dans le cyclohexane à 10^{-1}, 10^{-2} et 10^{-3} mole. l^{-1}.

Expérience	x	y	P	(MS) x 10^6	(D) x 10^6
1	0	0	0,082	0,75	4,77
2	0	0,1	0,56	5,11	2,45
3	0	0,2	0,67	6,11	1,79
4	0,1	0,3	1	9,12	0

Tableau III.8. Equilibre monomère - dimère pour la chlorophylle a dans l'heptane.

Substance solvatante : pyridine.
Concentration initiale : $1,03.10^{-5}$ mole. l^{-1}
Volume initial : 3 cm^3
x, y = additions (cm^3) de solutions, de pyridine dans l'heptane à 10^{-1} et 5.10^{-3} mole l^{-1}.

Expérience	x	y	P	(MS) x 10^6	(D) x 10^6
1	0	0	0,45	3,75	3,27
2	0	0,1	0,68	5,67	2,14
3	0	0,3	0,89	7,42	0,96
4	0,3	0,4	1	8,34	0

Tableau III.9.

Equilibre monomère - dimère pour la chlorophylle a dans le benzène.

Substance solvatante : pyridine
Concentration totale initiale = $1,03.10^{-5}$ mole.l^{-1}.
Volume initial = 3 cm^3.
x, y additions (cm^3) de solution de pyridine dans le benzène à 5.10^{-3} et 5.10^{-5} mole.l^{-1}.

Les figures III.35 et III.36 donnent le spectre complet du dimère comparé à celui du monomère pour chla dans heptane et chlb dans cyclohexane. On peut remarquer, au niveau de la bande de Soret, une diminution de l'absorption et un élargissement du spectre traduisant ici encore un dédoublement des différentes composantes.

II.5.3. * Calcul de la constante d'équilibre de dimérisation

Deux phénomènes viennent compliquer les calculs de constante d'équilibre.

- le premier résulte du fait que le dimère pur ne peut être obtenu ; ceci se traduit en particulier par un résidus de fluorescence dans le solvant apolaire pur. On peut l'interpréter par la présence de substance basique apportée soit par le solvant insuffisamment purifié, soit par la chlorophylle elle-même. Cette impureté, de concentration inconnue, perturbe les calculs, il faut donc en tenir compte.

- le deuxième résulte du fait que les chlorophylles a et b présentent, en solution, un équilibre entre deux isomères a et a' (ou b et b'). Le stéréoisomère a' se différencie de l'isomère a par le fait que le groupement ester OCH_3 du carbone 10, par sa position, diminue les pouvoirs donneur et accepteur du C=O pentanone et du magnésium central. Dans ces conditions, la formation du dimère est contrariée, et la constante de dimérisation est environ 10^3 fois plus faible que pour l'isomère a (LEICKNAM et al. 1978). Cet équilibre chla $\rightleftharpoons$ chla'doit être pris en compte pour le calcul des constantes de dimérisation.

Influence de l'impureté

Premier calcul

Les concentrations (MS) et (D) du monomère et du dimère sont déduites de l'étude des spectres d'absorption comme indiqué ci-dessus.Soit S_o la concentration qui aurait la substance solvatante S dans la solution ; la concentration (S) libre est donc S_o - (MS). On peut donc en déduire la constante d'équilibre $K = \frac{(MS)^2}{(D)(S)^2}$

Le tableau III.10 donne un exemple de valeur de K calculées pour différentes additions de S à une solution de départ, dans le cas de la chlorophylle b dans le cyclo hexane.

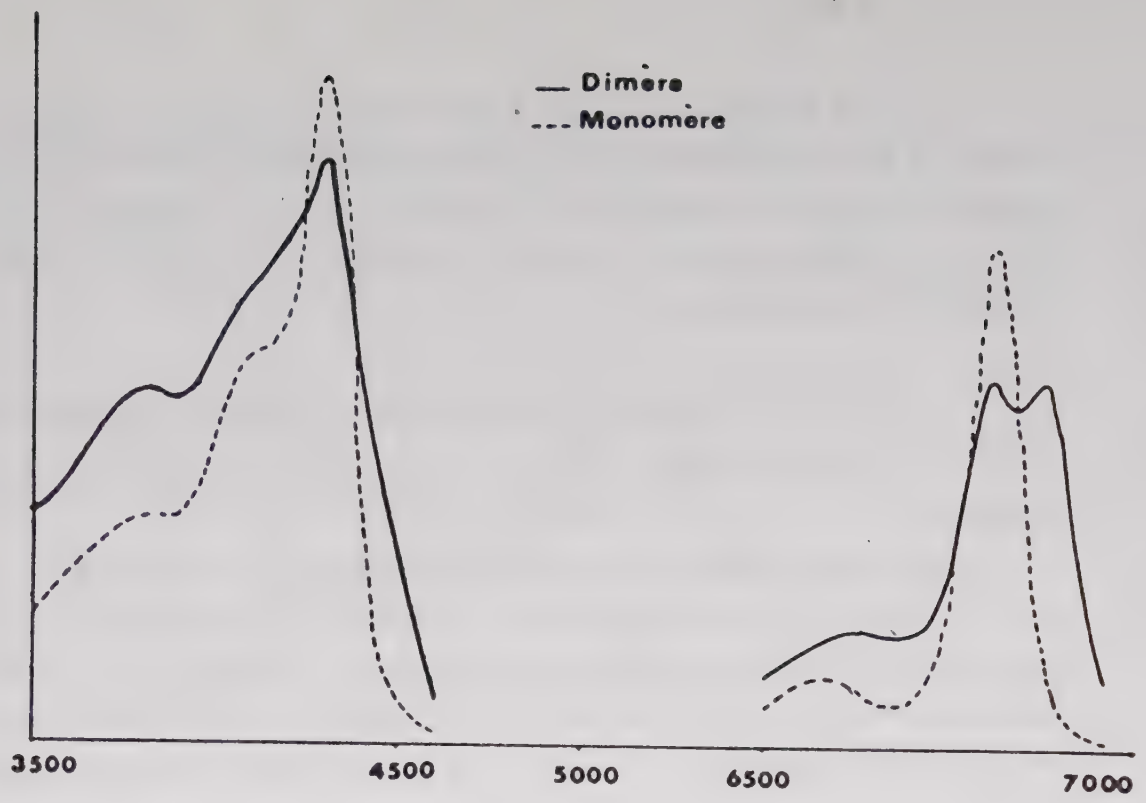


Fig. III. 35 - Spectres d'absorption du monomère et du dimère pour Chla dans l'heptane

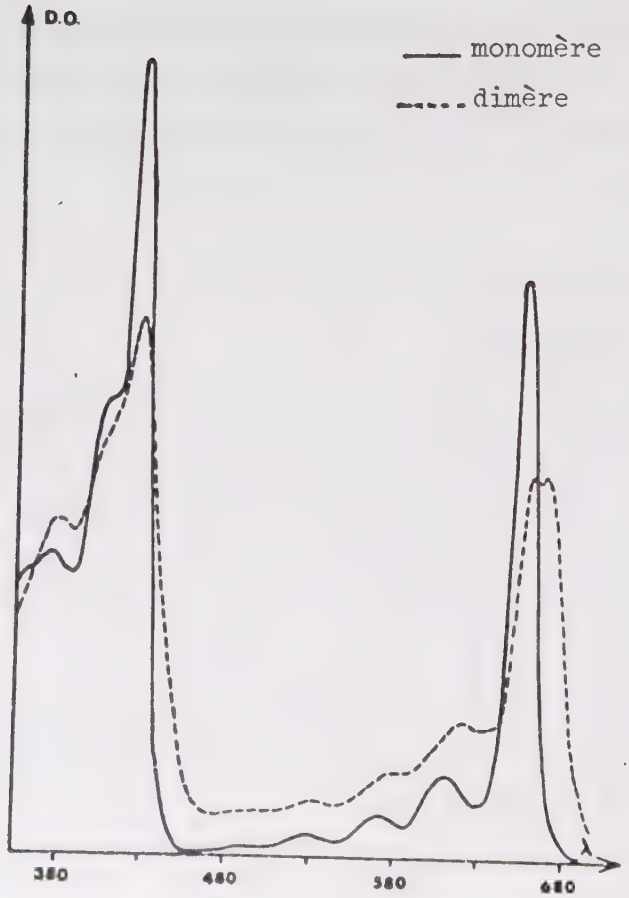


Fig. III. 36 - Spectres d'absorption du monomère et du dimère pour Chl b dans le cyclohexane

La dispersion des résultats est due à l'impureté basique évoquée ci-dessus. L'évolution régulière de K traduit le fait que ce taux d'impureté est d'autant plus sensible que la quantité de substance solvatante ajoutée est faible.

Deuxième calcul

L'hypothèse est la suivante : l'impureté présente dans la solution a les mêmes propriétés que la substance solvatante S, en particulier elle conduit à la même constante d'équilibre.

A partir de la constante K calculée sans correction, l'expérience de départ (aucune addition de S) permet de calculer la concentration de l'impureté et d'en tenir compte pour un nouveau calcul de K. Par itération, K converge vers une valeur limite. Le tableau III.10 donne les valeurs de K ainsi trouvées pour la même série. Ici encore, la dispersion des résultats nous oblige à chercher une autre hypothèse.

Troisième calcul

L'hypothèse est la suivante : l'impureté présente dans la solution conduit à un monomère solvaté ayant mêmes propriétés optiques que le monomère MS mais avec une constante d'équilibre propre K_o.

On peut écrire pour deux expériences, les relations suivantes

- expérience "0" sans addition de S

$$K_o = \frac{(MS_o)^2}{(D_o)(S_o)^2}$$

$(MS_o) = C_o$, (D_o), (S_o) représentent les concentrations en monomère, dimère et impureté libre. (MS_o) et (D_o) sont déduits des spectres d'absorption.

- Expérience "1" avec addition de S

$$K_o = \frac{(MS_{o1})^2}{(D_1)(S_{o1})^2}$$

$$K = \frac{(MS_1)^2}{(D_1)(S_1)^2}$$

avec (MS_{o1}) et (S_{o1}) concentrations en monomère solvaté par l'impureté et en impureté libre.

(MS_1) et (S_1) concentrations en monomère solvaté par S_1 et en substance S libre.

(D) concentration en dimère

On doit ajouter 3 relations de conservation

$(S_1) + (MS_1) = S_t$ concentration totale en S connue

$(MS_{o1}) + (MS_1) = C_1$ concentration totale en monomère déduite comme ci-dessus de l'étude du spectre d'absorption. Elle permet également d'en déduire la concentration en dimère (D_1).

$(MS_{o1}) + (S_{o1}) = (MS_o) + (S_o)$ conservation de l'impureté.

Il existe donc 6 relations pour les 7 inconnues : K, K_o, (S_o), (S_{o1}), (MS_{o1}), (MS_1), (S_1). La mise en oeuvre d'une troisième expérience conduit à un système de 11 équations non linéaires à 11 inconnues, dont la résolution est très lourde.

Nous avons préféré résoudre la problème en nous donnant arbitrairement différentes valeurs de K_o.

On obtient alors à partir des équations précédentes :

$$(MS_1) = C_1 - C_o \cdot \sqrt{\frac{(D_1)}{(D_o)}} \cdot \frac{1 + \sqrt{K_o\,(D_o)}}{1 + \sqrt{K_o\,(D_1)}}$$

et $(S) = S_t - (MS_1)$ d'où le calcul de K.

Le tableau III.10 donne, pour la même série que précédemment, les valeurs de K en fonction de K_o.

On peut en tirer deux conclusions :

- il n'existe pas de valeur de K_o conduisant à une dispersion minimum des valeurs de K. Par contre, cette dispersion est bien plus réduite que précédemment, ce qui confirme la validité de la méthode.

- la valeur de K_o influence peu la valeur de K, ce qui s'explique par le fait que les deux équilibres sont indépendants. Pour les autres exemples, nous avons choisi la valeur $K_o = 10^4$, ce qui correspond à un équilibre pour une impureté polaire peu active.

Le tableau III.11 donne les valeurs de K corrigées pour différents solvants et substances solvatantes S.

Expérience	P	K non corrigé	K corrigé 1ère méthode	K corrigé 2ème méthode pour Ko			
				100	1000	5000	10 000
1	0,425	2634	298	628	619	605	597
2	0,56	1415	427	611	603	590	582
3	0,65	1081	458	586	578	566	559
4	0,725	998	519	624	616	604	596
5	0,85	793	517	581	576	566	559
6	0,955	674	522	560	556	548	543
7	0,98	622	516	543	540	533	529
8	0,98	614	531	552	549	544	540

Tableau III.10 Valeur de K(1 $mole^{-1}$) constante d'équilibre monomère-dimère pour la chlorophylle b dans le cyclohéxane.

Substance solvatante : pyridine.

Chl	Solvant	Substance solvatante	K 1 $mole^{-1}$	K' 1 $mole^{-1}$
b	cyclohexane	pyridine	$(5,60 \pm 1)\ 10^{+2}$	$3,58\ 10^{-2}$
b	heptane	éther	$(1,9 \pm 0,3)\ 10^{-2}$	$1,22\ 10^{-2}$
a	heptane	acétone	$(5 \pm 2,5)\ 10^{-2}$	$3,2\ 10^{-2}$
a	heptane	pyridine	$(2,6 \pm 0,6)\ 10^{-2}$	$1,66\ 10^{-2}$
a	benzène	pyridine	$(15 \pm 2,5)\ 10^{3}$	$9,60\ 10^{3}$
a	heptane	THF	$3,94 \pm 1$	2,52

Tableau III.11. Valeurs de K pour divers solvants et substances solvatantes.

Influence de l'équilibre chla. ⇌ chla'

Il faut dans les calculs précédents, tenir compte de l'équilibre entre les deux stéréoisomères a et a'. chla ⇌ chla' de constante d'équilibre k. Soient (MS) la concentration en monomère solvaté correspondant à l'isomère a et (A') la concentration de l'isomère a'.

On peut donc écrire $\frac{(A')}{(MS)} = k$

Si on appelle C la concentration en monomère libre on a :

$(MS) + (A') = C = (MS) + k\,(MS) = (MS)\,(1+k)$

soit $(MS) = \frac{C}{1+k}$

et $(S) = S_t - (MS)$

Les relations du paragraphe précédent sont donc applicables en remplaçant C_o et C_1 par $C_o/(1+k)$ et $C_1/(1+k)$

On obtient alors en posant $k' = \frac{1}{1+k}$

$$(MS_1) = k'C_1 - k'C_o \sqrt{\frac{(D_1)}{(D_o)}} \cdot \frac{1 + \sqrt{K_o(D_o)}}{1 + \sqrt{K_o(D_1)}}$$

et $(S_1) = S_t - (MS_1)$

La constante K' ainsi calculée s'exprime en fonction de K_o et des concentrations en monomère et dimère déduites de l'étude des spectres d'absorption.

On peut également remarquer une relation entre K' et K calculée comme au paragraphe précédent

$$\frac{K'}{K} = \frac{k'^2\,(S_t - (MS_1))^2}{[S_t - k'\,(MS_1)]^2}$$

Souvent la concentration en substance polaire S est grande devant la concentration en monomère solvaté et on a alors :

$$\frac{K'}{K} \simeq k'^2 \qquad \text{soit } K' \simeq K \times k'^2$$

Le choix de k est délicat car l'équilibre, qui dépend de la température et surtout du solvant, est mal connu quantitativement.

Dans CCl_4, la quantité d'isomères a' est d'environ 20 %, soit k = 0,25. On en déduit k' = 0,8 et $k'^2 = 0,64$

Les valeurs de K' correspondantes sont données dans le tableau III.11.

II.6. Etude des états triplets.

Les solutions dégazées contenant divers pourcentages de monomère et de dimère déterminés comme précédemment ont été étudiées par photolyse éclair. Les variations de la densité optique ΔD immédiatement après l'éclair donnent, connaissant le spectre d'absorption de la solution non activée, la densité optique DO des espèces excitées. L'augmentation de l'énergie de l'éclair d'irradiation ne modifiant pas la valeur de ΔD, on admet que toutes les espèces sont portées à l'état triplet.

Le tableau III.12 donne un exemple de mesures pour la chlorophylle a dans l'heptane, la substance solvatante étant la pyridine. Nous pouvons en déduire les coefficients d'absorption spécifique du monomère et du dimère ε_M et ε_D ; on a en effet $DO = l x \varepsilon_M(MS) + l x \varepsilon_D(D)$ l étant la longueur du trajet optique dans la cuve. A une longueur d'onde donnée, deux expériences suffisent pour calculer ε_M et ε_D. Le tableau III.13 donne quelques résultats obtenus en couplant deux par deux une série d'expériences. Il faut noter la dispersion des résultats, due en particulier à la dégradation de la chlorophylle soumise aux éclairs d'irradiation. En particulier aucune mesure n'a pu être faite avec l'acétone comme substance solvatante, chaque flash détruisant une quantité importante de chlorophylle.

II.7. Structure du dimère

Afin d'avoir un modèle plus précis, nous avons cherché à déterminer les caractéristiques géométriques du dimère. Pour cela, nous avons appliqué le modèle de KASHA. Les résultats de fluorescence nous conduisent à la conclusion que les deux bandes du dimère sont égales en intensité. Dans ces conditions $\varepsilon_H = \varepsilon_L$ et la formule 1 nous permet d'évaluer θ soit $\theta = \frac{\pi}{2}$ pour tous les dimères. Cela signifie que les deux moments de transition pour la bande rouge font dans l'espace un angle de 90° et que le modèle type 1 est à exclure car il conduit à $\Delta\nu = 0$.

Longueur de la cuve	(MS)	(D)	D pour λ			D pour λ		
			480	470	460	480	470	460 nm
5 cm	$0,373.10^{-5}$	$0,711.10^{-5}$	0,592	0,781	0,766	0,942	1,156	1, 341
5 cm	$0,454.10^{-5}$	$0,514.10^{-5}$	0,646	0,858	0,85	0,846	1,058	1,175
5 cm	$0,778.10^{-5}$	$0,37 .10^{-5}$	0,749	0,967	0,974	0,924	1,167	1,274
2 cm	$1,18 .10^{-5}$	$0,185.10^{-5}$	0,378	0,52	0,53	0,458	1,60	0,64

Tableau III.12. Etats triplets d'un mélange monomère - dimère pour la chlorophylle a dans l'heptane.

Substance solvatante : pyridine.

Substance solvatante	Longueurs d'onde			
	480	470	460 nm	
Pyridine	1,77 ± 0,3	2,3 ± 0,3	2,4 ± 0,4	$\varepsilon_M \times 10^{-4}$
	1,77 ± 0,3	2,15± 0,4	2,5 ± 0,4	$\varepsilon_D \times 10^{-4}$
Ether	1,71 ± 0,3			$\varepsilon_M \times 10^{-4}$
	1,35 ± 0,4			$\varepsilon_D \times 10^{-4}$

Tableau III.13. Valeurs de ε_M et ε_D pour la chlorophylle a dans l'heptane (en $mole^{-1}$ cm^{-1}).

L'écart $\Delta\lambda$ entre les deux composantes de la bande du dimère permet de calculer la distance L entre les centres des molécules de pigment. L'écart $\Delta\lambda$ est évalué en décomposant la bande rouge, pour une solution quelconque, en trois bandes : une pour le monomère et deux pour le dimère. Nous avons choisi de représenter chaque composante par une fonction de Gauss. Ceci est justifié par le fait que la bande rouge, dans un solvant polaire, est bien représentée par une telle fonction. Pour cela on donne pour chaque composante, les trois paramètres ε_o, ν_o, δ définissant la gaussienne $\varepsilon = \varepsilon_o \exp\left[-\log_2 \left(\frac{\nu-\nu_o}{\delta}\right)^2\right]$. Par approximations successives, on cherche les neuf paramètres qui donnent la courbe résultante la plus proche de la courbe d'absorption expérimentale. On constate encore que la déconvolution conduit à deux bandes identiques pour le dimère. Les résultats sont donnés par les figures III.37 à III.42 pour différents pigments dans différents solvants.

La connaissance de ε_o, δ et ν_o pour le monomère et de $\Delta\nu$ pour le dimère permet de calculer f, D^2 et L pour différents pigments dans différents solvants. Le tableau III.14 donne les résultats obtenus.

On peut faire les constatations suivantes :

- L varie peu d'un solvant à l'autre pour un même pigment, avec une légère déstabilisation du dimère dans le benzène.
- l'interaction est plus importante pour la chlorophylle b puisque la distance L est nettement plus faible pour ce pigment. Ceci prouve que le groupe C = O du cycle II, très polaire, participe à l'interaction dipôle dipôle pour le renforcer.

Il peut être intéressant de raccorder les résultats ci-dessus avec les modèles proposés pour le dimère de la chlorophylle dans les solvants apolaires. Deux principales structures ont été avancées :

- un modèle asymétrique (COTTON et al 1974, BALLSCHMITTER et KATZ 1969). Dans ce modèle, l'interaction entre deux molécules de pigment se fait par l'atome de Mg d'une molécule et le groupement cétone du cycle V d'une deuxième molécule. Deux arrangements sont proposés, avec équilibre statistique entre les deux (Fig. III-43). Ce modèle asymétrique, où un atome Mg et un groupement C=O restent libres dans le dimère, permet d'expliquer la formation de composés (tétramères, oligomères) détectés dans certains solvants à plus grande concentration.

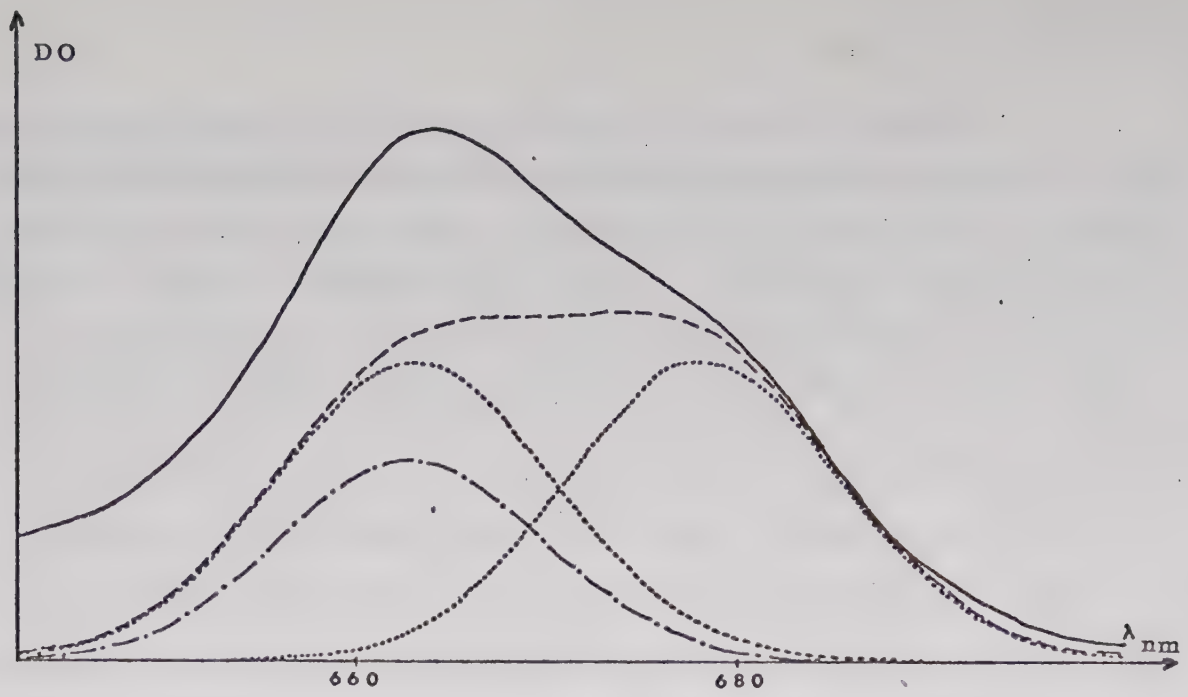


Fig. III. 37 - Déconvolution de la bande rouge pour Chl a dans le cyclohexane

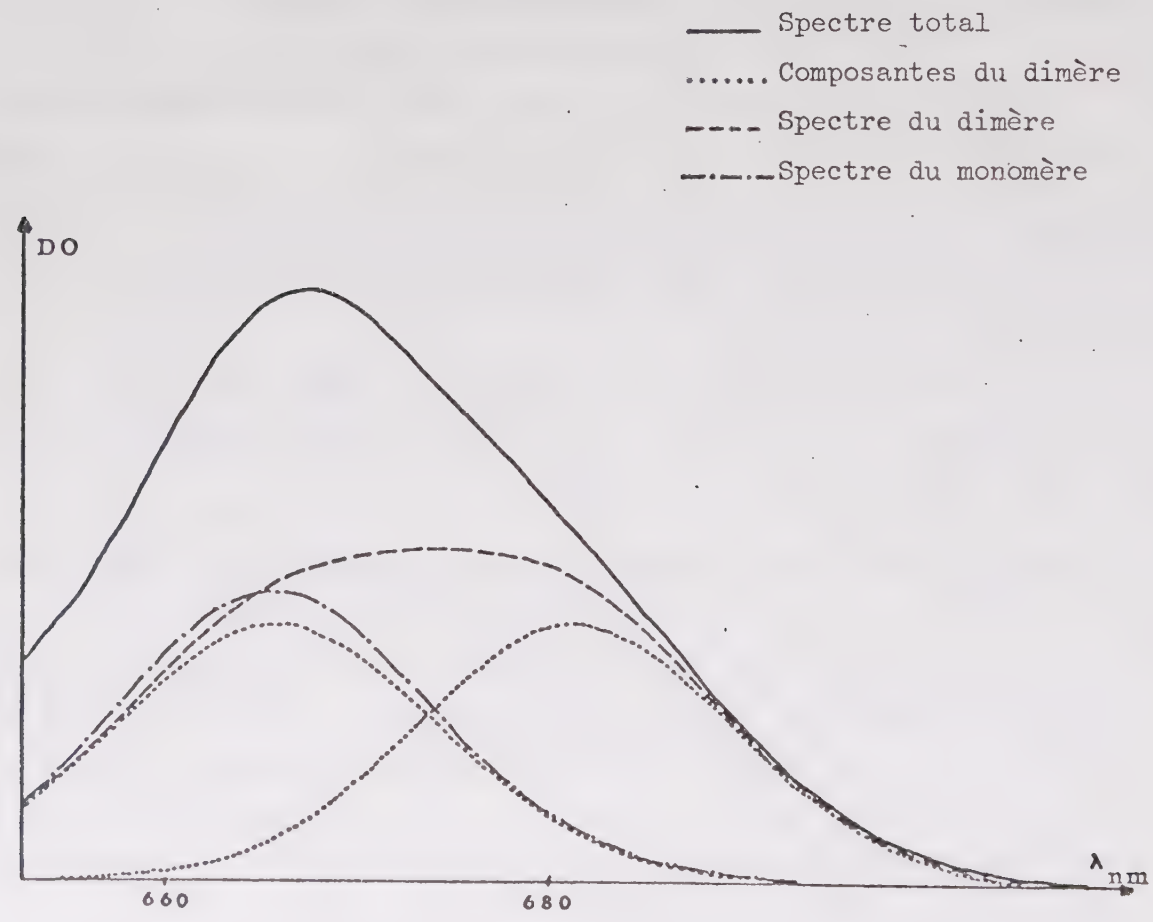


Fig. III. 38 - Déconvolution de la bande rouge pour Chl a dans le benzène.

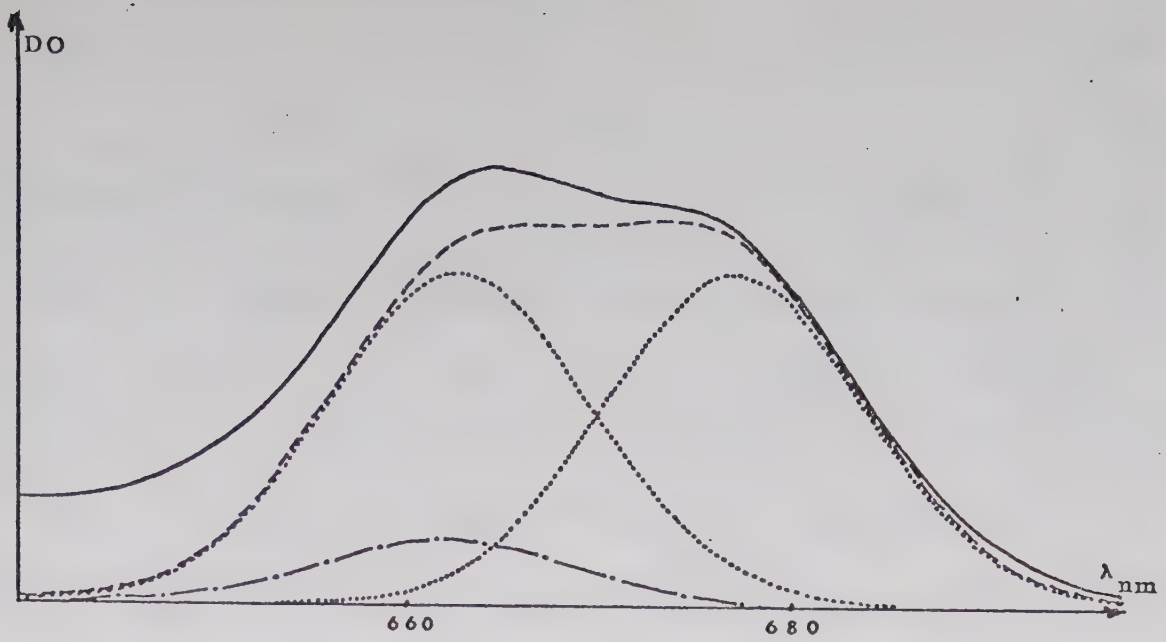


Fig. III. 39 - Déconvolution de la bande rouge pour Chl a dans l'heptane

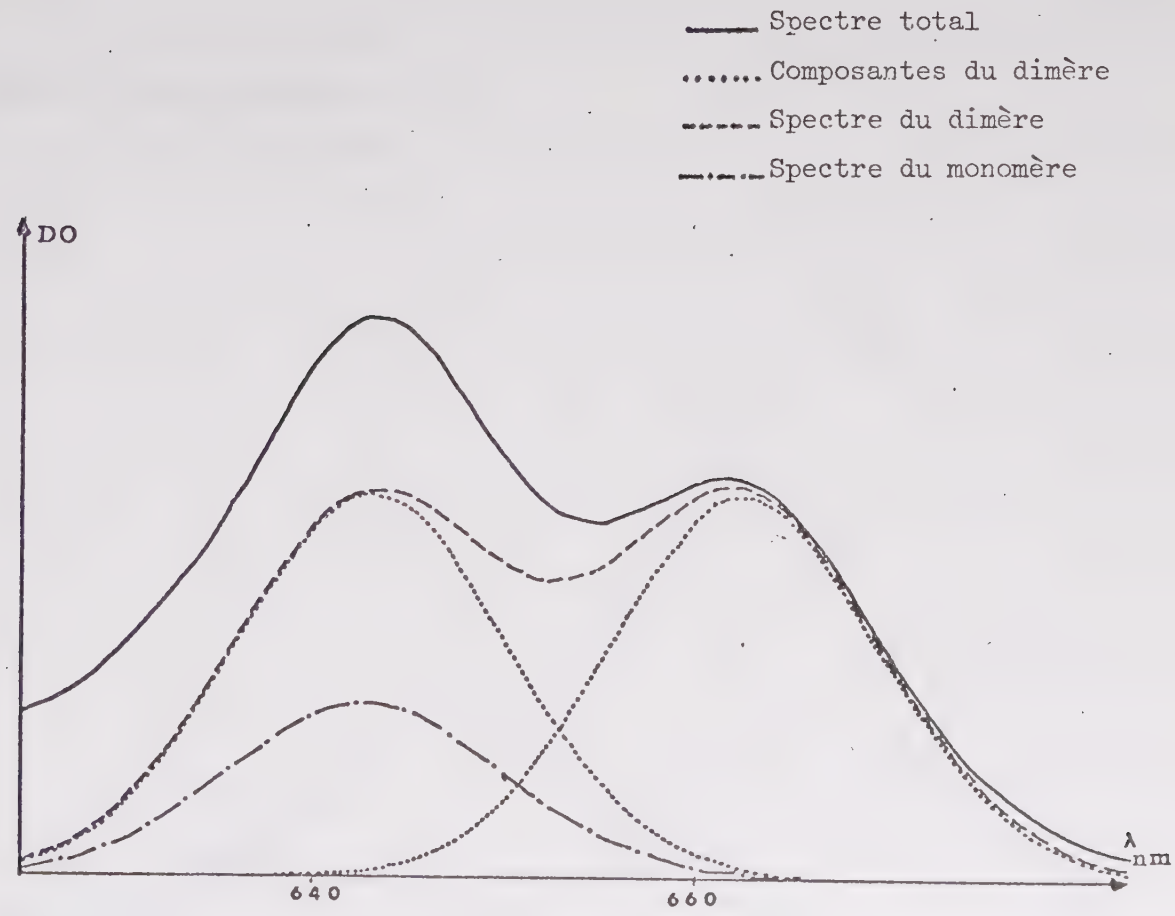


Fig. III. 40 - Déconvolution de la bande rouge pour Chl b dans le cyclohexane

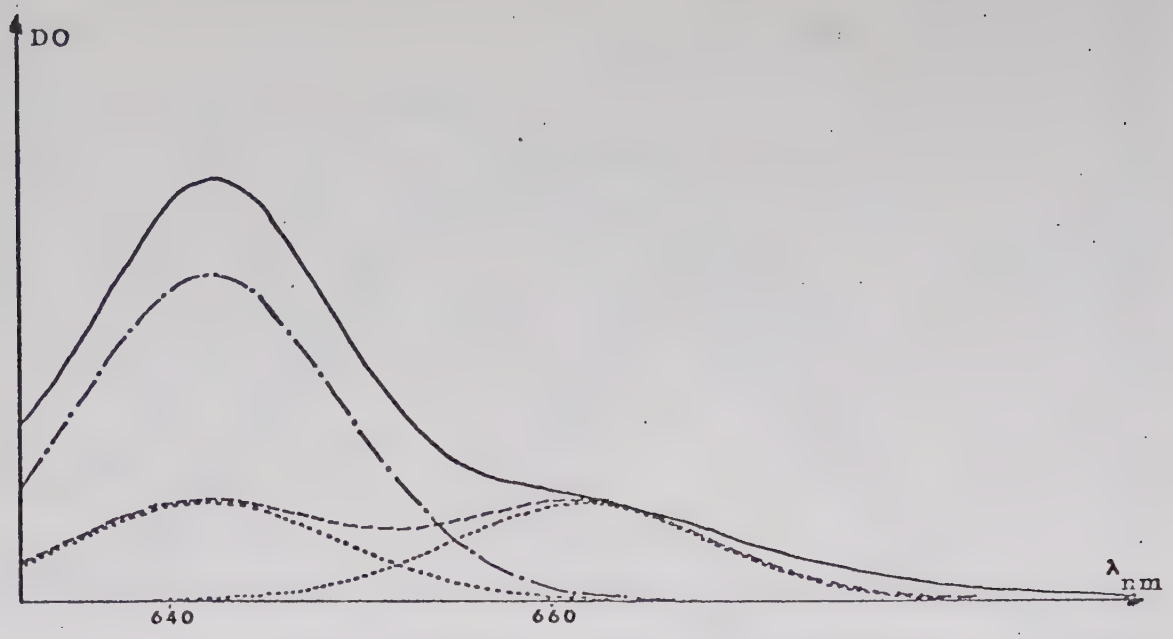


Fig. III. 41 - Déconvolution de la bande rouge pour Chl b dans le benzène

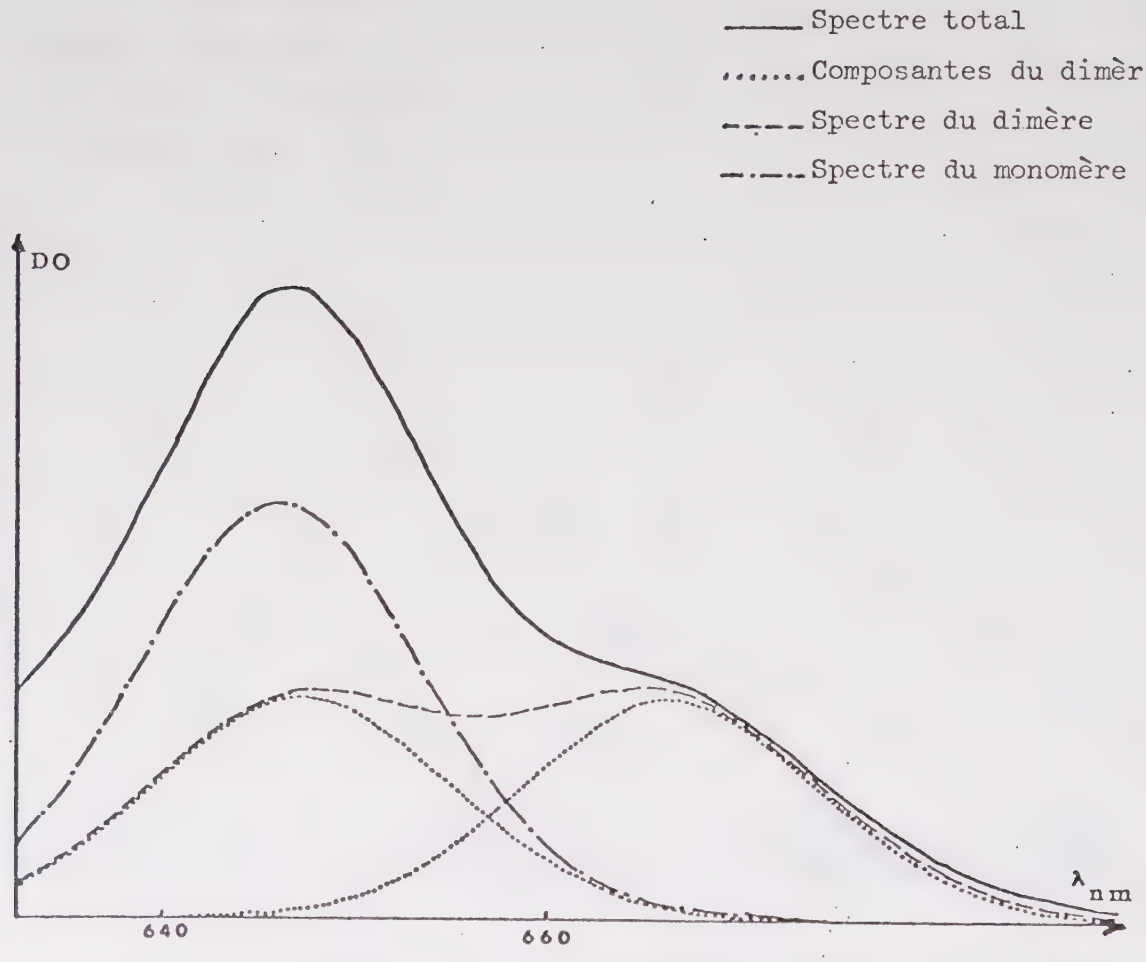


Fig. III. 42 - Déconvolution de la bande rouge pour Chl b dans l'heptane

Pigment	Solvant	$\Delta\bar{\nu}$(Å)	ε_o	f	$D^2 \times 10^{35}$	R(Å)
Chla	Heptane	147	$8\ 10^4$	0,134	1,18	9,5
Chla	Benzène	155	$7,8\ 10^4$	0,154	2,173	9,9
Chla	Cyclohexane	151	$8,2\ 10^4$	0,138	1,94	9,6
Chlb	Heptane	196	$4,5\ 10^4$	0,0805	1,098	7,1
Chlb	Benzène	191	$5,4\ 10^4$	0,101	1,385	7,8
Chlb	Cyclohexane	200	$4,6\ 10^4$	0,087	1,19	7,3

Tableau III.14 Caractéristiques spectroscopiques du monomère et du dimère.

- un modèle symétrique (FONG et KOESTER 1975, FONG 1975)
Ici l'interaction se fait entre l'atome de Mg et le groupe CO de l'ester fixé sur le cycle 5 (carbone C 10). De plus, les deux liaisons C=O .... Mg sont impliquées et conduisent à un dimère symétrique, avec deux molécules en position tête-bêche et dont les plans sont parallèles. (Fig III.44).
Le modèle symétrique de FONG correspond à la disposition géométrique de la figure III.27 type 1. Il correspond bien à un angle voisin de 90° entre les moments M_1 responsables de la bande rouge. Par contre, il conduit à un écart $\Delta\nu = 0$ donc aucun dédoublement du spectre d'absorption.

D'autre part ce modèle rend difficilement compte de la différence entre Chla et Chlb pour la distance L. La diminution de L pour Chlb suggère que le groupe C=O lié au cycle II intervient au niveau de l'atome Mg, ce qui est impossible dans ce modèle symétrique.
Le modèle asymétrique de KATZ, moins bien défini dans l'espace, laisse plus de latitude pour le rendre compatible avec nos résultats.
Les deux modèles limites de la fig III.43 correspondent à la disposition géométrique du type 2 de la figure III.27. Dans les deux cas, on peut constater que l'angle entre les moments de transition M_1 de chaque molécule est sensiblement de 90°.
D'autre part, compte tenu de l'inclinaison des deux cycles, la distance des centres des molécules est plus important et peut être évalué aux environs de 10 A°.
Ce modèle permet également de faire intervenir le groupement C=O spécifique de CHlb. La distance L plus faible pour Chlb peut s'interpréter par une interaction complémentaire entre l'atome Mg et le groupement C=O du cycle II.
Une configuration intermédiaire entre les deux modèles de KATZ peut-être envisagée (Fig.III.45).

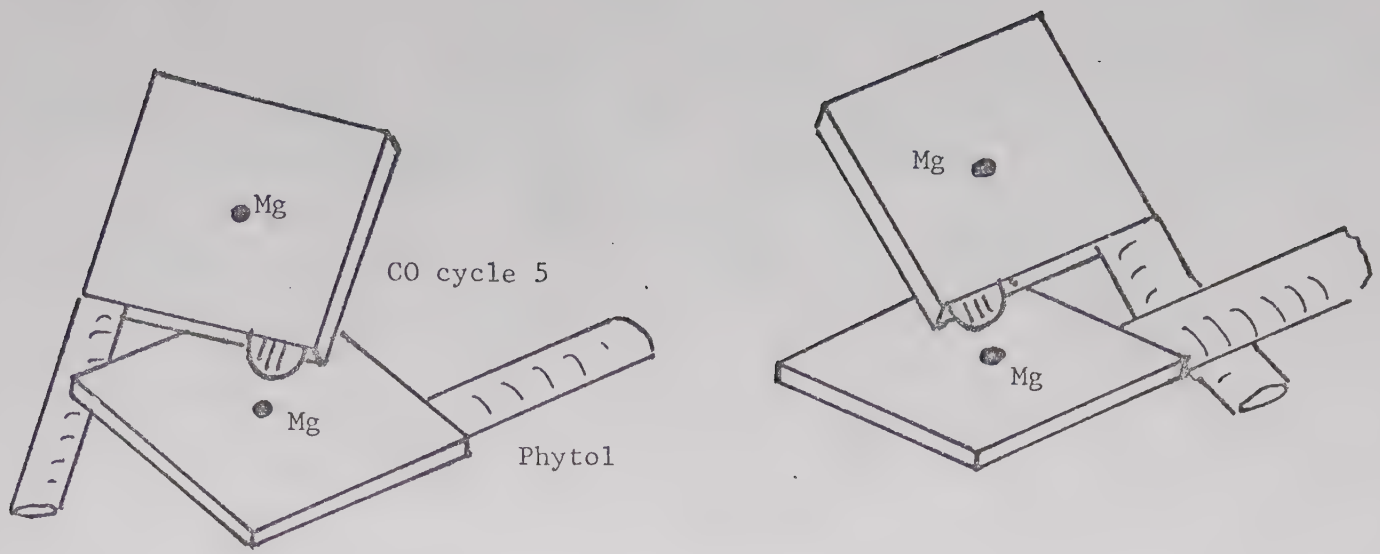


Fig.III.43. Modèles asymétriques de KATZ pour le dimère de la chlorolphylle

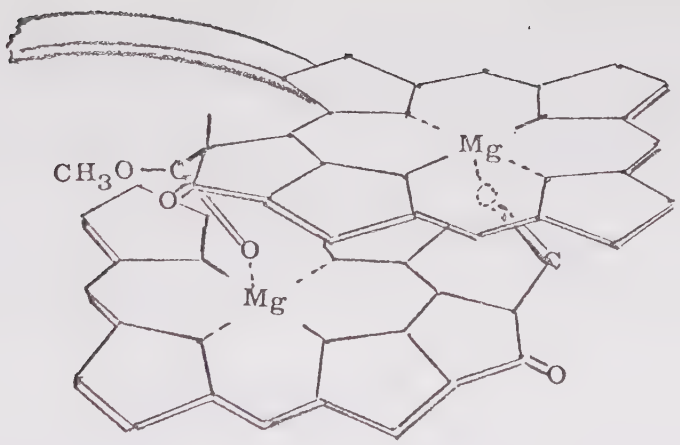


Fig III. 44 Modèle symétrique de FONG pour le dimère de la chlorophylle

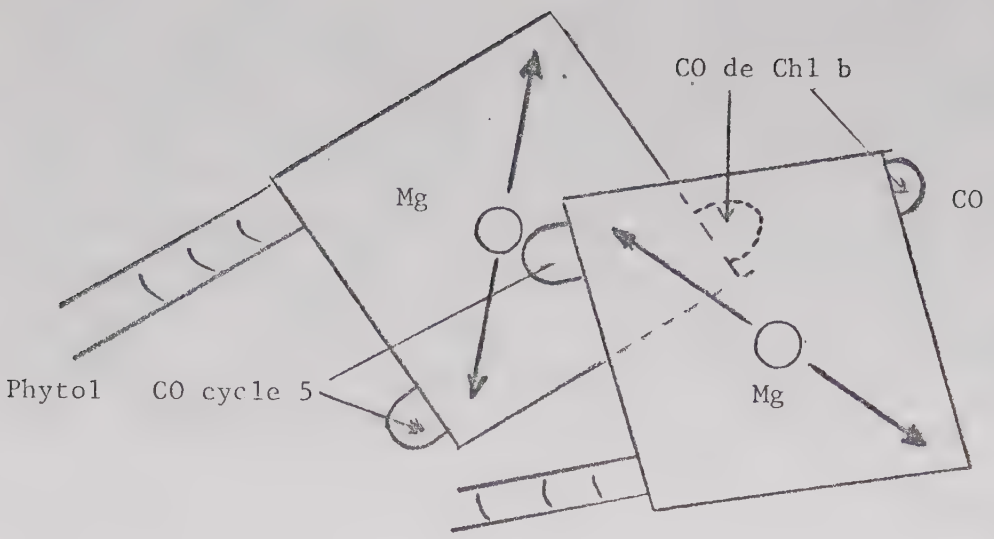


Fig III.45. Modèle asymétrique pour le dimère de la chlorophylle b

AMSTER R. L., PORTER G.
Proc. Royal Soc. (London) 296 (38) 1967

ANDERSON A.F.H., CALVIN M.
Arch. Biochem. Biophys. 107 (251) 1964

BALLSCHMITTER K., TRUESDELL K., KATZ J. J.
Biochim. Biophys. Acta 184 (604) 1969

BALLSCHMITTER K., KATZ J. J.
J. Am. Chem. Soc. 91 (2661) 1969

COLEMAN J. S., VARGA L. P., MASTIN S. M.
Inorg. Chem. 9 (1015) 1970

COTTON T. M., TRIFUNAC A. D., BALLSCHMITTER K., KATZ J. J.
B. B. A. 368 (181) 1974

FONG F. K., KOESTER V. J.
Jal. Am. Chem. Soc. 97 (6888) 1975

FONG F. K.
Jal. Am. Chem. Soc. 97 (6890) 1975

FREED S., SANCIER K. M.
Jal Amer. Chem. Soc. 76 (198) 1954

KANKARE J. J.
Analytical Chemistry 42.12. (1322) 1970

KATAKIS D.
Analytical Chemistry 37. 7. (876) 1965

KATZ J. J., CLOSS G. L., PENNINGTON E. C., THOMAS M. R., STRAIN H. H.
J. Amer. Chem. Soc. 85 (3801) 1963

KATZ J. J., STRAIN H. H., LEUSSING D. L., DOUGHERTY R. C.
J. Amer. Chem. Soc. 80 (784) 1968

LANE E. H., CHRISTIAN S. D., GARLAND F.
Jal Phys. Chem. 80 (690) 1976

LAVOREL J.
Jal Phys. Chem. 61 (1600) 1957

LEICHNAM J. P., HENRY M., KLEO J.
J. Chim. Phys. (Phys. Chim. Biol) 75 (529) 1978
75 (535) 1978

LIVINGSTON R., WATSON W., McARDLE J.
Jal Amer. Chem. Soc. 71 (1542) 1949

LIVINGSTON R.
Quart. Rev. Chem. Soc. 14 (189) 1960

McRAE E. G., KASHA M.
. Jal. Chem. Phys. 28 (721) 1958
. In Physical Progress in Radiation Biology
Ed. L. AUGENSTEIN Acad. Press New-York p. 23 1964

SHIPMAN L. I., COTTON T. M., NORRIS J. R., KATZ J. J.
Jal Amer. Chem. Soc. 98 (8222) 1976

SZALAY L., TOROK M., GOUINDJEE
Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. 2 (425) 1967

WALLACE R. M.
Jal. Phys. Chem. 64 (899) 1960

WALLACE R. M., KATZ S. M.
Jal Phys. Chem. 68 (3890) 1964

APPENDICE

Quand deux (ou plusieurs) espèces chimiques sont en interaction, chacune d'elle est perturbée par le champ de l'autre. Les propriétés spectroscopiques de l'ensemble formé sont alors modifiées, les modifications étant fonction de l'importance de l'interaction (distance des espèces, orientation des moments de transition, recouvrement des orbitales électroniques) et de la nature de l'élément (ion, molécule).

La théorie des excitons moléculaires est une méthode de traitement de la perturbation des états excités de deux molécules (ou plusieurs) couplées par une interaction forte mais sans échange d'électrons et avec un recouvrement faible des orbitales moléculaires Chaque individu conserve donc son identité et la théorie des perturbations pourra être utilisée.Une composition vectorielle classique des moments de transition permet également de déterminer l'intensité des bandes d'absorption et les règles de sélection entre états excités. (KASHA et al 1965 ; Mc RAE et KASHA 1964).

ANALYSE MATHEMATIQUE

Soient ϕ_u et ϕ_v les fonctions d'onde décrivant les états fondamentaux de deux molécules identiques constituant un dimère. La nature de l'interaction conduit à choisir pour l'état fondamental du dimère la fonction

$$\phi = \phi_u \cdot \phi_v$$

L'Hamiltonien correspondant au dimère peut se mettre sous la forme

$$H = H_u + H_v + V_{uv}$$

V_{uv} représente le terme d'interaction entre les espèces u et v. L'énergie de l'état fondamental du dimère prend alors la forme

$$E = \int\int \phi_u \, \phi_v \, H \, \phi_u \, \phi_v \, d\tau_u \, d\tau_v$$

$$= E_u + E_v + \Delta E$$

Le dernier terme représente l'énergie d'interaction entre les états fondamentaux des deux molécules u et v

Un état excité du dimère doit s'exprimer en fonction de deux fonctions

$$\phi_1 = \phi_u \, \phi_v^+$$

$$\phi_2 = \phi_u^+ \, \phi_v$$

ϕ_u^+ et ϕ_v^+ représentant les états excités des molécules u et v d'énergie E_u^+ et E_v^+

Un état stationnaire pour le dimère est de la forme

$$\phi_E = r \, \phi_1 + s \, \phi_2$$

d'énergie E_E telle que $H \, \phi_E = E_E \, \phi_E$

En posant $H_{uu} = H_{vv} = \int\int \phi_u^+ \quad \phi_v \; H \; \phi_u^+ \; \phi_v \; d\tau_u \; d\tau_v$

$$H_{uv} = H_{vu} = \int\int \phi_u^+ \; \phi_v \quad H \; \phi_u \; \phi_v^+ \; d\tau_u \; d\tau_v$$

On trouve une solution pour r et s si le déterminant

$$\begin{vmatrix} H_{uu} - E_E & H_{uv} \\ H_{uv} & H_{uu} - E_E \end{vmatrix} = 0$$

Soient $E'_E = H_{uu} + H_{uv}$

$$E''_E = H_{uu} - H_{uv}$$

avec les fonctions d'onde correspondantes

$$\phi_E = \frac{1}{\sqrt{2}} \; (\phi_1 + \phi_2)$$

$$\phi''_E = \frac{1}{\sqrt{2}} \; (\phi_1 - \phi_2)$$

on en déduit

$$E'_E = E_u^+ + E_v + \Delta E' + \mathcal{E}$$

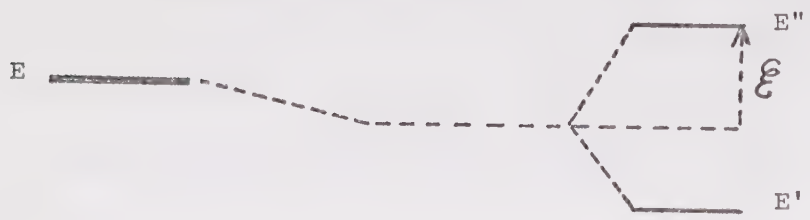
$$E''_E = E_u^+ + E_v + \Delta E' - \mathcal{E}$$

avec

$$\Delta E' = \int\int \phi_u^+ \; \phi_v \; V_{uv} \; \phi_u^+ \; \phi_v \; d\tau_u \; d\tau_v$$

$$\mathcal{E} = \int\int \phi_u^+ \; \phi_v \; V_{uv} \; \phi_u \; \phi_v^+ \; d\tau_u \; d\tau_v$$

Le terme le plus important est $\mathcal{E}$; il traduit un dédoublement énergétique de l'état excité ; les termes ΔE, $\Delta E'$ représentent les déplacements de l'état fondamental et de la moyenne de l'état excité.



Le spectre d'absorption du dimère est donc constitué de deux bandes dont l'écart est $2\mathcal{E}$.

Le calcul de $\mathcal{E}$ fait intervenir le potentiel d'interaction V_{uv}. Ce potentiel, de nature électrostatique, peut être développé en termes monopolaires, dipolaires, etc... Pour deux espèces neutres et en forte interaction, l'interaction dipole-dipole est prépondérante. $\mathcal{E}$ représente alors l'énergie entre deux dipoles de moments M_u et M_v situés à la distance r. Un calcul classique donne :

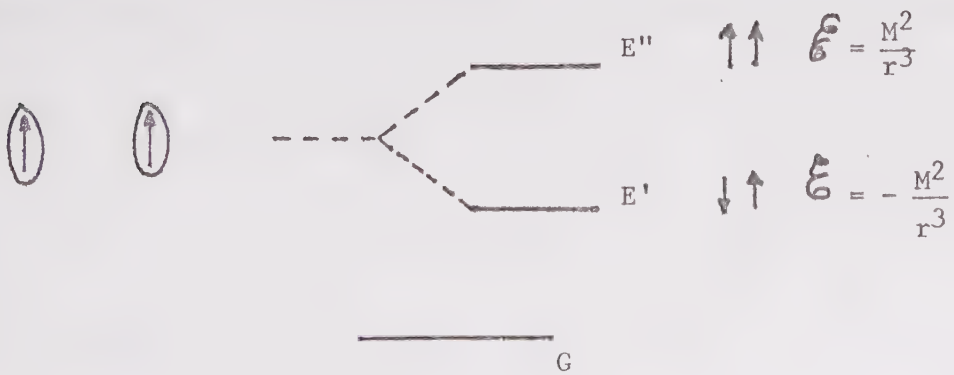
$$\mathcal{E} = \frac{\vec{M_u}\,\vec{M_v}}{r^3} - \frac{3\,(\vec{M_u}.\vec{r}).(\vec{M_v}.\vec{r})}{r^5}$$

Cas particuliers

L'énergie $2\mathcal{E}$ est fonction de l'orientation des deux molécules de moments de transition M_u et M_v. D'autre part, l'intensité de chacune des raies d'absorption nécessite la connaissance du moment de transition de chacune des bandes. Ce moment sera obtenu par composition vectorielle classique de M_u et M_v, les deux cas étant obtenus en changeant l'orientation d'un des deux vecteurs.

Premier cas

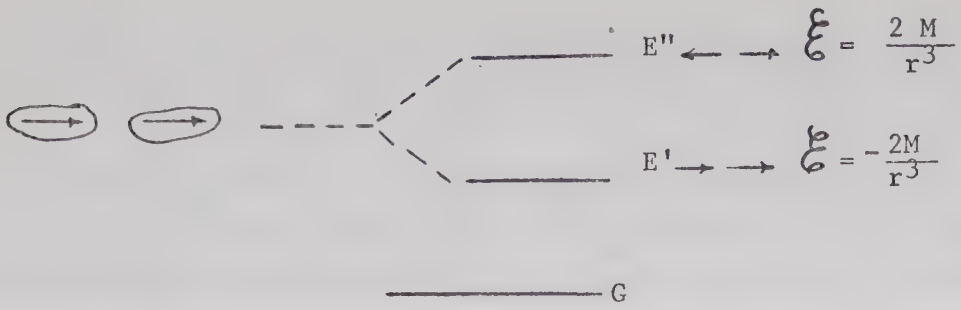
Dans ce cas, les deux molécules ont leur moment de transition parallèles.



La composition vectorielle de M_u et M_v fait apparaitre que seul le niveau E" correspond à un moment de transition non nul. Dans ce cas, il y a déplacement vers le bleu de la bande d'absorption.

Deuxième cas

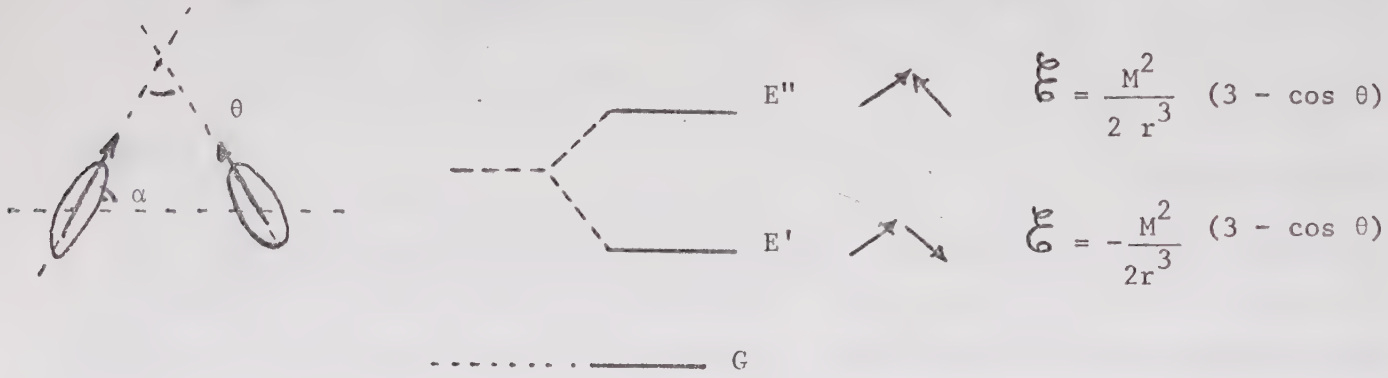
Dans ce cas, les deux moments de transition sont alignés



La composition vectorielle de M_u et M_v fait apparaitre que seul le niveau E' correspon à un moment de transition non nul. Il y a donc dans ce cas déplacement vers le rouge d la bande d'absorption.

Troisième cas

Les deux moments de transition font un angle θ entre eux et sont coplanaires



Ici les deux transitions sont permises et l'écart entre les deux bandes vaut :

$$\frac{M^2}{r^3}(3-\cos\theta)$$

La composition vectorielle des deux moments M_u et M_v donne les deux moments résultants

$$M' = 2M\cos\alpha \quad \text{et} \quad M'' = 2M\sin\alpha$$

soit $$\operatorname{tg}\alpha = \frac{M''}{M'} = \operatorname{cotg}\frac{\theta}{2}$$

ou $$\theta = 2 \operatorname{arc\,tg}\frac{M'}{M''}$$

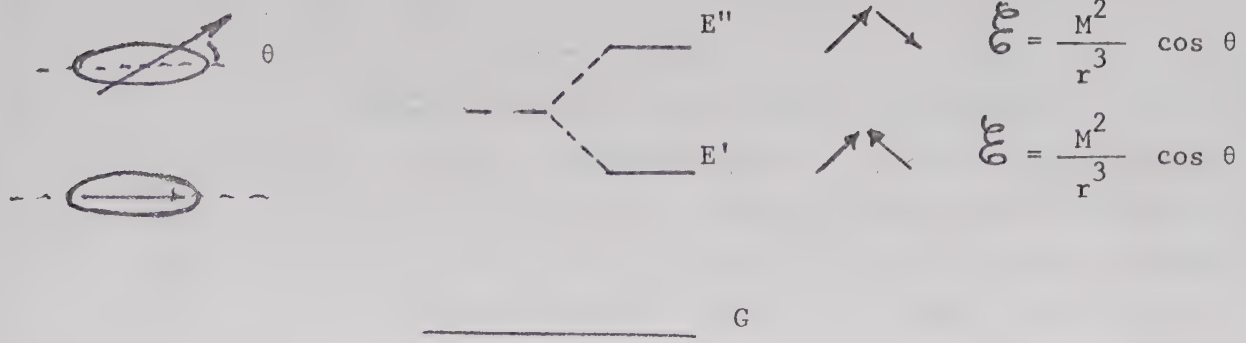
avec $$\frac{M'}{M''} = \sqrt{\frac{f'}{\nu'}\cdot\frac{\nu''}{f''}}$$

f' (f") étant la force de l'oscillateur de la bande centrée à la fréquence ν ' (ν") soit, si le dédoublement est faible en valeur relative

$$\theta = 2\,\mathrm{Arctg}\sqrt{\frac{f'}{f''}}$$

Quatrième cas

Les deux moments de transition font un angle θ entre eux mais les molécules sont disposées dans deux plans parallèles



La composition vectorielle des moments donne le même résultat qu'en 3

$$\theta = 2 \operatorname{Arctg} \sqrt{\frac{f'}{f''}}$$

L'écart énergétique entre les deux niveaux vaut ici

$$2 \frac{M^2}{r^3} \cos \theta$$

KASHA M., RAWLS H. R., ASHRAF EL BAYOUMI
Pure. Appl. Chem. 11.371 1965

MC RAE E. G., KASHA M.,
Physical Processes in Radiation Biology p. 23
Acad. Press. New-York 1964

CHAPITRE IV - ETUDE EN MILIEU ORIENTE

L'orientation de la chlorophylle a été surtout tentée en la plaçant dans une structure bidimensionnelle. Le dépôt de films contenant le pigment à la surface de l'eau a permis d'étudier les phénomènes de transfert énergétique (TWEET 1964). L'étude de l'orientation proprement dite a été réalisée sur des membranes de lipides par dichroïsme linéaire. Les angles des moments de transition et du plan de la molécule par rapport à la membrane ont été ainsi calculés (CHERRY 1972). Des couches phospholipides ont été également utilisées (HOFF 1973).

Une nouvelle voie d'orientation des molécules a été ouverte avec les cristaux liquides. Depuis la découverte de l'effet d'orientation d'un colorant dans un nématique (HEILMEIER 1968) de nombreuses études ont été menées. L'application à la chlorophylle a été réalisée la première fois dans le cadre du laboratoire (HOCHAPFEL et al. 1971). L'inclusion dans un cristal liquide a permis soit d'étudier l'interaction pigment solvant (FRACKOVIAK et al. 1977) soit de servir de modèle pour l'étude de transfert électronique photoinduit (AIZAWA 1978). Une autre application importante est la possibilité d'étudier le dichroïsme pour les bandes complexes (bande de Soret) et d'en déduire les moments de transition correspondant aux différentes composantes (JOURNEAUX VIOVY,1978)

Cette étude est un aspect du problème général de la propagation de la lumière dans un milieu anisotrope, non homogène et absorbant. C'est pourquoi dans une première partie nous étudierons le problème général avant de l'appliquer aux pigments.

Deux types de milieux ont été étudiés :

- les milieux nématiques

les molécules sont orientées suivant une direction privilégiée conduisant à un milieu uniaxe.

- les milieux cholestériques

on peut les considérer comme la superposition de tranches parallèles élémentaires de nématique mais la direction privilégiée de chaque tranche tourne régulièrement, conduisant ainsi à une structure en hélice dont l'axe est perpendiculaire aux plans élémentaires. Le pas de l'hélice est la plus petite distance qui sépare deux plans déduits l'un de l'autre par une rotation de 2π.

I. Préparation du milieu.

I.1. Etats du milieu cristal liquide

Les solutions de colorants dans les cristaux liquides sont le plus souvent utilisées sous faibles épaisseurs (quelques dizaines de microns) en fabriquant un sandwich entre deux lames de verre, les cales étant constituées par un milieu inerte (mylar, téflon).

On réalise de plus une orientation macroscopique du milieu conduisant à un milieu uniaxe dans le cas des nématiques. Deux cas limites sont le plus souvent utilisés

- l'axe optique est perpendiculaire aux faces de la cuve : c'est la structure homéotrope. Pour une observation perpendiculaire à la cuve, le milieu se comporte comme un cristal isotrope.

- l'axe optique est parallèle aux faces de la cuve : c'est la structure homogène. En observation normale, le milieu est uniaxe, l'axe optique est parallèle à la direction d'orientation. Les deux indices qui interviennent sont n_o, indice ordinaire pour une polarisation perpendiculaire à l'axe optique, et n_e indice extraordinaire principal pour une polarisation parallèle à l'axe optique.

Dans le cas des cholestériques, les surfaces de la cuve imposent également des conditions aux limites pour les tranches élémentaires en contact avec ces surfaces.

On peut enfin réaliser un milieu proche d'un milieu cholestérique en imposant à un nématique deux orientations différentes à la surface limite ; c'est le cas des nématiques tordus (twisted nematics).

I.2. Techniques d'orientation

L'orientation macroscopique du milieu peut se réaliser de deux manières différentes :

- traitement des surfaces de la cuve

Les conditions limites imposées par les surfaces traitées imposent par continuité une orientation globale pour des épaisseurs allant jusqu'à plusieurs centaines de microns.

- action d'un champ extérieur E ou B

Ici l'orientation se fait au niveau du volume ; elle peut éventuellement être contrariée par les effets de surface.

I.2.1. Traitement des surfaces de la cuve.

a) méthode de Chatelain (CHATELAIN 1943)

C'est l'une des plus anciennes et la plus rapide. Elle consiste à frotter les deux faces de la cuve sur une surface rugueuse (papier, étoffe) suivant une direction fixe. Les deux directions de frottement étant mises parallèles à la constitution de la cuve, le cristal va s'orienter suivant la direction de frottement. Pour certains cristaux liquides (MBBA) cette technique conduit à des résultats reproductibles et stables pendant plusieurs heures. Dans d'autres cas, l'orientation est peu stable (K15) ou même inexistante.

b) traitement de surface par évaporation sous vide

L'évaporation sous vide de produits tel que l'or, S_iO sur une lame lui donne la propriété d'orienter le cristal liquide mis à son contact.

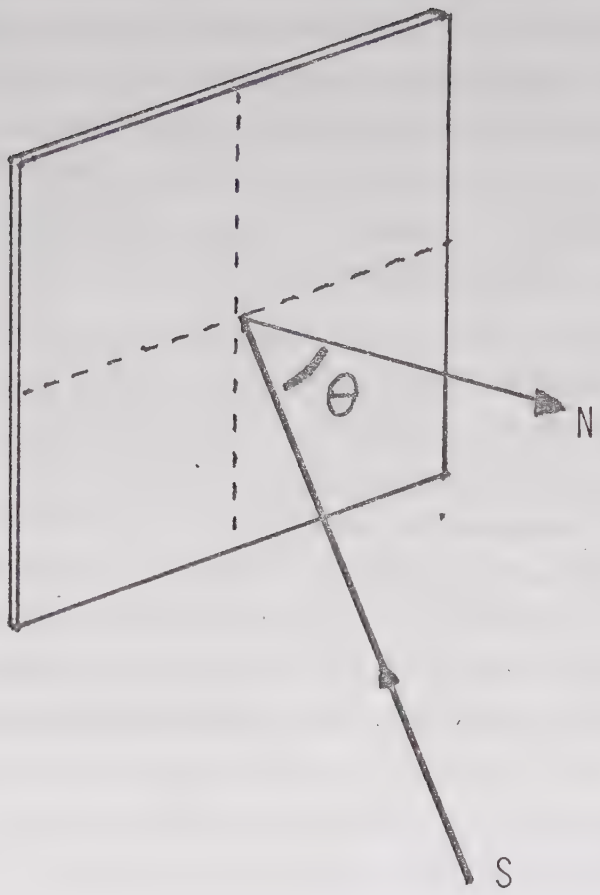
Les propriétés orientantes sont fonction de l'angle d'incidence θ sous lequel a été évaporée la substance (Fig. IV.I.) (URBACH et al. 1974).

- si $\theta > 75°$, la direction d'orientation est sensiblement parallèle au plan d'incidence, mais avec un angle d'ancrage variable.
- si $\theta < 75°$ la direction d'orientation est sensiblement perpendiculaire au plan d'incidence, avec un angle d'ancrage au maximum de quelques degrés.

C'est cette dernière condition que nous avons utilisée, avec S_iO comme substance. Bien que de réalisation expérimentale plus difficile, elle conduit à une surface n'absorbant pas la lumière dans le domaine visible. Cette technique d'orientation conduit à des résultats reproductibles, stables, en particulier peu sensibles aux variations de température et au passage du cristal liquide à l'état isotrope.

c) traitement de surface par dépôt de substance

Le dépôt sur la surface de substance ayant des sites d'interactions possible avec le verre, confère à cette surface un pouvoir orientant important. L'orientation homéotrope peut être réalisée par un dépôt de substances amphiphiles (lécithines, céphalines, acides gras) (HILTROP et STEGEMEIER, 1978). L'orientation homogène peut être réalisé par traitement (silanes par exemple) suivi de frottement parallèlement à une direction (KAHN, 1973).



N normale à la lame

S source de substance traitante

Fig IV. 1. Disposition géométrique pour l'évaporation en incidence oblique.

1.2.2. Action d'un champ extérieur

Les cristaux liquides peuvent être orientés par un champ extérieur : induction magnétique B, champ électrique E.

a) induction magnétique B

Les molécules de cristal liquide s'orientent suivant la direction du champ B. Pour un cristal orienté par des effets de surface importants, un champ minimum est nécessaire pour modifier complètement l'effet de surface (transition de Frederiks).

b) champ électrique E

Deux cas sont à considérer :

- cristaux liquides à anisotropie diélectrique positive ($\varepsilon// > \varepsilon\perp$)

L'orientation se fait parallèlement au champ électrique (continu ou alternatif). L'élimination des effets d'électrodes conduit à l'utilisation de champ alternatif.

- cristaux liquides à anisotropie diélectrique négative ($\varepsilon// < \varepsilon\perp$)

L'orientation des molécules se fait cette fois perpendiculairement au champ. Mais l'augmentation progressive du champ conduit à plusieurs états successifs :

- faibles champs : orientation
- potentiel critique V_c : distorsion périodique et formation de domaines (domaines de Williams).
- au delà de V_c

l'orientation macroscopique a disparu, et la turbulence due aux charges libres rend le milieu très diffusant (diffusion dynamique ou dynamic scattering).

Le potentiel V_c dépend de la fréquence ω du potentiel appliqué. Pour $\omega > \omega_c$, le potentiel V_c est plus élevé et permet donc d'obtenir un domaine de stabilité plus étendu.

II. Propagation de la lumière dans un cristal liquide

La propagation de la lumière dans les milieux cholestériques a fait l'objet de nombreuses études théoriques et expérimentales.

Les premiers résultats sont ceux de DE VRIES (DE VRIES 1951) démontrant la réflexion sélective de lumière circulaire. Plusieurs moyens d'étude ont été proposés pour la propagation d'une onde électromagnétique dans un milieu stratifié non homogène : utilisation d'une matrice 4 x 4 (BERREMAN 1972)

résolution des équations de Maxwell (CONNERS 1968), utilisation des matrices 2 x 2 de JONES (MARATHAY 1971 ; AZZAM, BASHARA 1972). AZZAM et BASHARA ont en particulier donné une solution générale de la propagation d'une onde polarisée circulairement dans un milieu cholestérique non absorbant (AZZAM, BASHARA 1977).

Dans le cas de propagation non parallèle à l'axe hélicoïdal, le problème n'admet que des solutions numériques complexes (TAUPIN 1969, TAUPIN et al. 1978).

La présence d'une substance absorbante dans le milieu complique les calculs. En particulier la méthode utilisée par AZZAM et BASHARA ne permet plus de résoudre complètement le problème. Ces deux auteurs ont donné un certain nombre de résultats théoriques en utilisant le formalisme des vecteurs de Stokes (AZZAM 1978) sur les milieux homogènes absorbants et sur les milieux non homogènes non absorbants. Des résultats expérimentaux ont été obtenus concernant la transmission anormale quand le pas de l'hélice est voisin de la longueur d'onde (NITYANANDA et al. 1973). L'absorption de la lumière naturelle et l'influence d'un champ électrique ont été étudiées par WHITE et TAYLOR (WHITE 1974) et COLE - AFTERGUT (COLE, AFTERGUT 1978). Enfin SACKMANN et VOSS ont montré que l'orientation de molécules de colorants dans un cholestérique conduit à un dichroïsme circulaire important dans la zone d'absorption du colorant (SACKMANN, VOSS 1972).

Les calculs qui sont présentés ici traitent le cas de l'absorption de la lumière polarisée dans un milieu quelconque en incidence normale et parallèle à l'axe hélicoïdal dans le cas des milieux cholestériques. Le formalisme utilisé est celui des matrices de JONES (JONES 1941). Il permet de calculer en chaque point du milieu, l'état de polarisation de l'onde transmise et l'intensité transportée. (JOURNEAUX et al 1981).

II.1. Définitions et notations

Le milieu étudié est rapporté à un système d'axes Oxyz. La lumière se propage suivant l'axe Oz ; le milieu est limité par les deux plans parallèles à xOy.

Les angles dans le plan xOy sont comptés positivement dans le sens trigonométrique, la lumière venant vers l'observateur.

Le champ électrique de l'onde est pris sous la forme

$E = Eo \exp \left[- \frac{2\pi j}{\lambda} (n - jk) z \right]$, Eo étant l'amplitude complexe dépendant du temps. Cette expression est valable pour un milieu isotrope homogène d'indice de réfraction n et d'indice d'extinction k. Dans le cas d'un milieu homogène anisotrope uniaxe (axe optique Ox), le champ se décompose en deux composantes

$$E_u = E_{uo} \exp \left[- \frac{2\pi}{\lambda} jz (n_u - jk_u) \right] \qquad u = x, y$$

Les grandeurs n_x et k_x sont les indices extraordinaires, les grandeurs n_x et k_y sont les indices ordinaires.

Si le détecteur est insensible à la lumière polarisée, l'intensité lumineuse mesurée est proportionnelle à $I = \Sigma E_u E_u^{\star}$

d'où $I = E_{x_o}^{\ 2} \exp \left[- \frac{4\pi}{\lambda} k_x z \right] + E_{y_o}^{\ 2} \exp \left[- \frac{4\pi}{\lambda} k_y z \right]$

Pour une direction de polarisation u = (u = x,y)

$$I = I_{ou} \exp \left[- \frac{4\pi}{\lambda} k_u z \right] = I_{ou}\ 10^{-Du}$$

Du, est la densité optique, pour cette direction de polarisation mesurée au spectrophotomètre.

On en déduit $k_u = 2{,}3 \frac{\lambda Du}{4\pi z}$ (1)

La grandeur k_u caractérise la colorant responsable de l'absorption. Elle est de forme

$k_u = K \frac{C}{n_u} g_u \langle \vec{\mu}^2_u \rangle$ $\vec{\mu}$ étant le moment de transition du colorant

g_u le facteur de Lorentz-Lorentz traduisant l'anisotropie du champ interne (SCHELLMAN 1975). La valeur moyenne est prise sur le temps et les diverses orientations possibles de $\vec{\mu}$.

II.2. Propagation dans un nématique

Depuis les premiers résultats de HEILMEIER et ZANONI (HEILMEIER, ZANONI 1968) on sait que les molécules d'un colorant peuvent s'orienter dans un nématique, conduisant à un dichroïsme linéaire important.

Les deux composantes obéissent aux lois de transmission

$$E_u = E_{uo} \exp \left[- \frac{2\pi}{\lambda} z\, j(n_u - j\, k_u) \right] \quad u = x, y$$

Si Eo champ incident est obtenu par un polariseur faisant avec Ox l'angle ϕ on obtient

$E_{xo} = E_o \cos \phi$

$E_{yo} = E_o \sin \phi$

$$d'où\ I(\phi) = E_o^2 \left[\exp\left(-\frac{4\pi}{\lambda} z k_x\right) \cos^2\phi + \exp\left(\frac{4\pi}{\lambda} z k_y\right) \sin^2\phi\right]$$

soit en introduisant le facteur de transmission τ

$$\tau(\phi) = A \cos^2\phi + B \sin^2\phi$$

$$\tau(\phi) = [\tau(0) - \tau(90)] \cos^2\phi + \tau(90) \qquad (2)$$

C'est la loi de Malus généralisée pour les transmissions.

Le dichroïsme linéaire $F = \frac{D(0)}{D(90)}$ est alors donné par l'expression

$$F = \frac{\log \tau(0)}{\log \tau(90)} = \frac{k_x}{k_y} = \frac{n_y}{n_x} \cdot \frac{g_x}{g_y} \frac{<\mu^2_x>}{<\mu^2_y>}$$

le rapport $\frac{<\mu_x^2>}{<\mu_y^2>}$ peut être évalué en fonction de la distribution statistique de la molécule de colorant dans le cristal liquide.

Soient θ l'angle de l'axe principal A de la molécule de colorant avec Ox, et β l'angle du monment de transition μ avec A (fig. IV.2.).

Les composantes de μ sont :

$$\mu_x = \mu [\cos\beta \cos\theta - \sin\beta \cos\psi \sin\theta]$$

$$\mu_y = \mu [\cos\beta \sin\theta \sin\alpha + \sin\beta \cos\theta \sin\alpha + \sin\beta \sin\psi \cos\alpha]$$

Les valeurs moyennes $<\mu_x^2>$ et $<\mu_y^2>$ doivent être prises sur les angles θ, α et ψ. θ possède une fonction de répartition conduisant au degré d'ordre S du colorant orienté par le cristal liquide ; on a

$<\cos^2\theta> = \frac{2S+1}{3}$ et $<\sin^2\theta> = \frac{2(1-S)}{3}$. Si on admet la symétrie de révolution autour de l'axe optique du cristal, on a

$<\sin^2\alpha> = <\cos^2\alpha> = \frac{1}{2}$.

De même, on admet la libre rotation de la molécule autour de A on obtient $<\cos^2\psi> = <\sin^2\psi> = \frac{1}{2}$

On aboutit au résultat final

$$F = \frac{n_y}{n_x} \cdot \frac{g_x}{g_y} \frac{2(1-S) + 6S\cos^2\beta}{S+2 - 3S\cos^2\beta} \qquad (3)$$

si $\beta = 0$

$$F = \frac{n_y}{n_x} \cdot \frac{g_x}{g_y} \frac{2S+1}{1-S} \qquad (4)$$

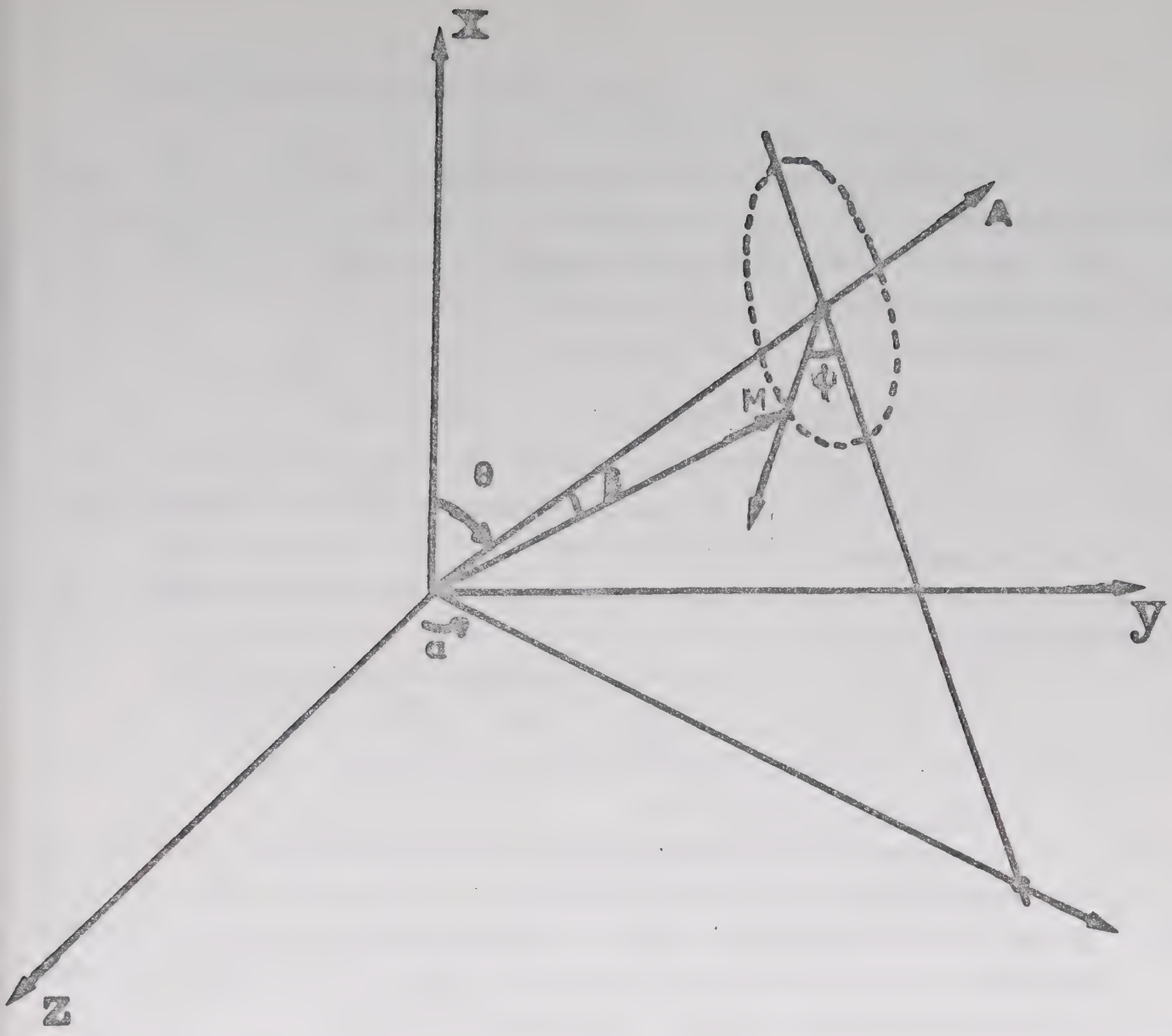


Fig. IV.2. Disposition géométrique du colorant dans le cristal liquide.

Cas d'une bande complexe

Quand une bande d'absorption résulte de l'existence de deux moments de transition, les relations précédentes doivent être modifiées. Supposons que deux moments $\vec{\mu}_1$ et $\vec{\mu}_2$ soient responsables de l'absorption à la longueur d'onde considérée. Soient β_1 et β_2 les angles de ces deux moments avec A. Soit p le pourcentage dû à $\vec{\mu}_1$ et 1-p la part due à $\vec{\mu}_2$, on a alors

$$k_x = pk_{1x} + (1-p)k_{2x}$$

$$k_y = pk_{1y} + (1-p)k_{2y}$$

La relation (2) est donc encore valable, $\tau(0)$ et $\tau(90)$ dépendant en plus du paramètre p.

En utilisant les densités optiques, on obtient l'équivalent de la relation (3).

$$F = \frac{n_y}{n_x}\,\frac{g_x}{g_y}\,\frac{6S\ p\ (\cos^2\beta_1 - \cos^2\beta_2) + 6S\cos^2\beta_2 + 2(1-S)}{3S\ p\ (\cos^2\beta_2 - \cos^2\beta_1) + S + 2 - 3S\cos^2\beta_2}$$

★ Correction de champ interne

La théorie de l'interaction champ électromagnétique - molécule fait intervenir le champ réel agissant au niveau moléculaire. Ce champ local n'est pas le champ extérieur appliqué mais le champ total tenant compte de la polarisabilité du milieu. Pour un milieu isotrope, le calcul est simple et conduit au facteur de correction de Lorentz-Lorentz $(\frac{n^2+2}{3})^2$

Dans un milieu anisotrope, la polarisabilité est elle-même anisotrope et le calcul plus complexe. DUNMUR a montré que le champ interne peut se mettre sous la forme (DUNMUR 1971, 1972).

$$E_{u\ int} = E_{u\ ext} \times g_u$$

avec $$g_u = 1 + Lu\ (n_u^2 - 1)$$

La même référence donne Lu pour différentes valeurs du paramètre de la maille du cristal. Le nouveau dichroïsme vaut alors :

$$F' = F \times \frac{g_x^2}{g_y^2}$$

BLINOV (BLINOV et al. 1975) en étudiant l'effet du champ interne sur un ion sphérique a trouvé expérimentalement que le terme correctif $(\frac{g_x}{g_y})^2$ valait 1 aux incertitudes expérimentales près. C'est cette hypothèse

que nous retiendrons pour la suite du calcul.

N.B. La formule la plus souvent utilisée dans la littérature est $F = \frac{2S+1}{1-S}$, expression du dichroïsme quand $\beta = 0$. Le terme $\frac{n_x}{n_y}$ de nos formules découle de l'expression de l'énergie électromagnétique transportée par l'onde. Il ne s'agit donc pas d'une correction de champ interne comme le suggère BLINOV.

* Choix de S

Dans les formules ci-dessus, S représente le degré d'ordre d'un axe $\vec{A}$ lié à la molécule de colorant. Un certain nombre d'études ont montré que ce degré d'ordre était le même que celui du cristal liquide quand la forme de la molécule de colorant était voisine de celle du nématique (CONSTANT et al. 1976). Nous avons supposé que cela reste vrai pour des molécules plus complexes, et qu'il existe donc un axe $\vec{A}$ lié à la molécule de pigment ayant même degré d'ordre que le cristal liquide.

II.3. Propagation dans les cholestériques ou les nématiques tordus

Ces milieux ne sont plus invariants par translation suivant l'axe O_z puisqu'il y a rotation continue de l'axe optique de la face d'entrée à la face de sortie. Le calcul peut s'effectuer en utilisant le formalisme matriciel de JONES pour les milieux non homogènes (JONES 1948).

Soient d l'épaisseur du cristal et a_T l'angle de torsion total. Pour une épaisseur dz la rotation de l'axe principal est donc

$$da = \frac{a_T}{d} dz = a_o dz$$

Nous supposons que la longueur d'onde est faible devant le pas de l'hélice pour être en dehors du domaine de réflexion sélective.

Soit $N_o(z)$ la matrice différentielle de Jones caractérisant l'état de polarisation à la cote z rapportée à des axes OXY parallèles aux axes de la lame élémentaire uniaxe . Ces axes font avec les axes Oxy l'angle $a = a_o z$.

Par définition $N_o(z) = \lim_{dz \to 0} \frac{T(z,z+dz) - U}{dz}$

$T(z,z+dz)$ matrice transmission de la tranche comprise entre z et $z+dz$.

U matrice unité

La matrice N(z) rapportée aux axes Oxy du laboratoire est donnée par

$N(z) = R(a)\ N_o(z)\ R(-a)$

avec $R(a) = \begin{vmatrix} \cos a & -\sin a \\ \sin a & \cos a \end{vmatrix}$

En introduisant le champ $E'(z) = R(-a_o z)E(z)$

on aboutit à l'équation différentielle

$$\frac{dE'(z)}{dz} = [No(z) - a_o R(\frac{\pi}{2})]\ E'(z) = N'(z)\ E'(z) \qquad (5)$$

La matrice N'(z) étant indépendante de z, l'intégration est possible

$$E'(z) = \exp(N'(z)\ z)\ E'o \qquad (6)$$

ce qui peut encore s'écrire

$$\begin{vmatrix} E'x \\ E'y \end{vmatrix} = \begin{vmatrix} n'_{11} & n'_{12} \\ n'_{21} & n'_{22} \end{vmatrix} \quad \begin{vmatrix} Exo \\ Eyo \end{vmatrix} \qquad (7)$$

Si le champ incident Eo est polarisé rectilignement et fait avec Ox l'angle ϕ, on a $E_{xo} = E_o \cos \phi$

$E_{yo} = E_o \sin \phi$

L'intensité lumineuse transmise est :

$$I = E'_x E'^*_x + E'_y E'^*_y$$

$$= E_x E_x^* + E_y E_y^*$$

puisqu'on passe de E à E' par une rotation

La relation 7 permet de conclure que

$$I = Io(A\cos^2\phi + B\sin^2\phi + C\sin\phi\cos\phi)$$

soit $\tau(\phi) = A\cos^2\phi + B\sin^2\phi + C\sin\phi\cos\phi \qquad (8)$

La fonction $\tau(\phi)$ présente un maximum pour un angle ϕ_o tel que $tg\ 2\phi_o = \frac{C}{A-B}$; en posant $\psi = \phi - \phi_o$ on aboutit à

$$\tau(\psi) = K_1 \cos^2 \psi + K_2 \qquad (9)$$

On retrouve une loi de Malus généralisée au milieu cholestérique.

L'angle ϕ_o peut être obtenu en traçant la courbe $\tau(\phi)$. On peut également l'obtenir par 3 mesures de transmission $\tau(0)$, $\tau(90)$ et $\tau(45)$

avec $tg2\phi_o = \frac{2\tau(45) - \tau(0) - \tau(90)}{\tau(0) - \tau(90)} \qquad (10)$

Calcul des coefficients A, B, et C.

Les grandeurs A, B et C de la relation (8) peuvent être calculées à partir de la relation (5) en explicitant la matrice N'(z).
La matrice T(z, z+dz) est la matrice d'une couche élémentaire rapportée à ses axes principaux ; elle s'écrit :

$$T(z,\ z+dz) = \begin{vmatrix} \exp - \frac{2\pi}{\lambda} jdz(n_x - jk_x) & o \\ o & \exp - \frac{2\pi}{\lambda} jdz(n_y - jk_y) \end{vmatrix}$$

$$= \begin{vmatrix} 1 - \frac{2\pi}{\lambda} jdz\ (n_x - jk_x) & o \\ o & 1 - \frac{2\pi}{\lambda} jdz(n_y - jk_y) \end{vmatrix}$$

$$\text{d'où } N'_o(z) \quad \begin{vmatrix} -\frac{2\pi}{\lambda} j(n_x\ jk_x) & o \\ o & -\frac{2\pi}{\lambda} j(n_y - jk_y) \end{vmatrix}$$

$$\text{et } N'(z) = \begin{vmatrix} -\frac{2\pi}{\lambda} j(n_x - jk_x) & a_o \\ -a_o & -\frac{2\pi}{\lambda} j(n_y - jk_y) \end{vmatrix}$$

En posant $a_x = n_x - jk_x$

$a_y = n_y - jk_y$

l'équation (5) s'écrit

$$\frac{d^2E'u}{dz} + \frac{2\pi}{\lambda} j(a_x + a_y)\frac{dE'u}{dz} + (a^2_o - \frac{4\pi^2}{\lambda^2} a_x a_y)\ E'_u = o \quad (u=X,Y) \qquad (11)$$

Les solutions générales sont de la forme

$$E'_x = A_1 e^{k1^z} + A_2 e^{k2^z}$$

$$E'_y = B_1 e^{k1^z} + B_2 e^{k2^z}$$

Les valeurs k_1 et k_2 sont solutions de l'équation caractéristique associée à (11). Les constantes d'intégration sont reliées entre elles par les relations :

$$B_1 = \frac{A_1}{a_o}\left(k_1 + \frac{2\pi}{\lambda} j a_x\right)$$

$$B_2 = \frac{A_2}{a_o}\left(k_1 + \frac{2\pi}{\lambda} j a_x\right)$$

Les conditions initiales permettent de calculer A_1 et A_2

$$A_1 = \frac{E_o a \sin\phi - E_o \cos\phi\left(k_2 + \frac{2\pi}{\lambda} j a_x\right)}{k_1 - k_2}$$

$$A_2 = \frac{-E_o a \sin\phi + E_o \cos\phi\left(k_1 + \frac{2\pi}{\lambda} j a_x\right)}{k_1 - k_2}$$

On en déduit les coefficients n'_{ij} de la matrice de la relation (7)

$$\left.\begin{aligned}
n'_{11} &= \frac{1}{k_1 - k_2}\left[\left(k_1 + \frac{2\pi}{\lambda} j a_x\right) e^{k_2 z} - \left(k_2 + \frac{2\pi}{\lambda} j a_x\right) e^{k_1 z}\right] \\
n'_{22} &= \frac{1}{k_1 - k_2}\left[\left(k_1 + \frac{2\pi}{\lambda} j a_x\right) e^{k_1 z} - \left(k_2 + \frac{2\pi}{\lambda} j a_x\right) e^{k_2 z}\right] \\
n'_{21} = -n'_{12} &= \frac{-a_o}{k_1 - k_2}\left[e^{k_1 z} - e^{k_2 z}\right]
\end{aligned}\right\} \quad (12)$$

On peut en déduire les termes de la relation (8) avec les notations suivantes :

$$\rho^2 e^{2j\psi} = a^2_o + \frac{\pi^2}{\lambda^2}(a_x - a_y)^2$$

$$r e^{j\theta} = \frac{\pi}{\lambda}(a_x - a_y)$$

$$K = \frac{1}{4\rho^2} \exp -\frac{2\pi}{\lambda} z(k_x + k_y)$$

$$
\left.
\begin{aligned}
A &= K\,[(a_o^2+r^2+\rho^2-2\rho r\cos(\psi-\theta))\,\exp(-2z\rho\sin\psi) \\
&\quad +(a_o^2+r^2+\rho^2+2\rho r\cos(\theta-\psi))\,\exp(+2z\rho\sin\psi)] \\
B &= K\,[(a_o^2+r^2+\rho^2+2\rho r\cos(\psi-\theta))\,\exp(-2z\rho\sin\psi) \\
&\quad +(a_o^2+r^2+\rho^2-2\rho r\cos(\psi-\theta))\exp(2z\rho\sin\psi)] \\
C &= K\,[4a_o r\sin\theta(\exp(2z\rho\sin\psi)+\exp(-2z\rho\sin\psi)) \\
&\quad -8a_o r\sin\theta\cos(2z\rho\cos\psi)]
\end{aligned}
\right\} \quad (13)
$$

III. Applications dans les cholestériques et nématiques tordus.

Les résultats précédents permettent de calculer les caractéristiques de la lumière transmise par un échantillon. Suivant les applications envisagées, deux sortes de résultats sont à évaluer :

- si on ne s'intéresse qu'à l'intensité, on utilise les relations (8), (10 et (13)
- si on s'intéresse à l'état de polarisation de la lumière dans le milieu et à sa sortie, les relations (7) et (12) fournissent les résultats.

III.1. Etude de l'intensité transmise

On peut appliquer les résultats théoriques précédents soit aux cholestériques, soit aux nématiques tordus. Nous avons déterminé par ordinateur quelques résultats concernant ces deux types de milieux.

III.1.1. Cas des cholestériques

Nous avons choisi pour visualiser les résultats les grandeurs suivantes : $\emptyset_o$, $R = \tau(0)/\tau(90)$, τ_{max}, τ_{min}. Ces deux dernières grandeurs sont obtenues pour $\emptyset = \emptyset_o$ et $\emptyset = \emptyset_o + \frac{\pi}{2}$.

Ces quatre grandeurs sont étudiées en fonction de α_T. Nous avons pris comme exemples numériques de référence les données de COLE et AFTERGUT (COLE, AFTERGUT 1978). Nous y avons ajouté les valeurs numériques arbitraires à titre de comparaison.

Les caractéristiques de l'échantillon sont les suivantes :

épaisseur d = 12,5 μ

longueur d'onde λ = 550 mm

k_x et k_y sont choisis de façon à réaliser des densités optiques $D_x = 1,25$ et $D_y = 0,15$ pour le nématique associé dans les mêmes conditions.

n_x et n_y ont les valeurs $n_x = 1,774$ et $n_y = 1,528$ pour le premier exemple. Les deux autres exemples correspond à $n_x - n_y = 0,14$ et 0,05 (seule cette différence apparaît dans les calculs).

La figure IV.3. traduit ces résultats. On peut faire plusieurs constatations :

- quand l'angle de torsion augmente $R \longrightarrow 1$ et $\tau max \longrightarrow \tau min$ l'anisotropie d'absorption disparait donc ;

- la biréfringence du nématique associé joue un très grand rôle. Quand elle diminue, les limites sont atteintes plus rapidement, et surtout l'angle ϕo peut atteindre des valeurs importantes pour un dichroïsme encore marqué.

III.1.2. Cas des nématiques tordus

Ici l'angle de torsion est limité à 90°. Nous avons cette fois tracé les quatre grandeurs précédentes en fonction de d. Les biréfringences sont les mêmes que dans le premier exemple. k_x et k_y sont calculés pour chaque épaisseur afin que les densités optiques du nématique associé de même caractéristique soient $D_x = 1,25$ et Dy = 0,15.

La figure IV.4. traduit ces résultats.

On peut faire les remarques suivantes :

- quand d augmente, le dichroïsme augmente pour tendre vers celui du nématique non tordu.

- quand d augmente $\phi o \longrightarrow 0$. C'est donc aux faibles épaisseurs que le nématique tordu se distingue le plus nettement du nématique ordinaire.

- ici encore, la biréfringence joue un rôle important. Ce sont les matériaux les moins biréfringents qui s'écartent le plus nettement du nématique ordinaire.

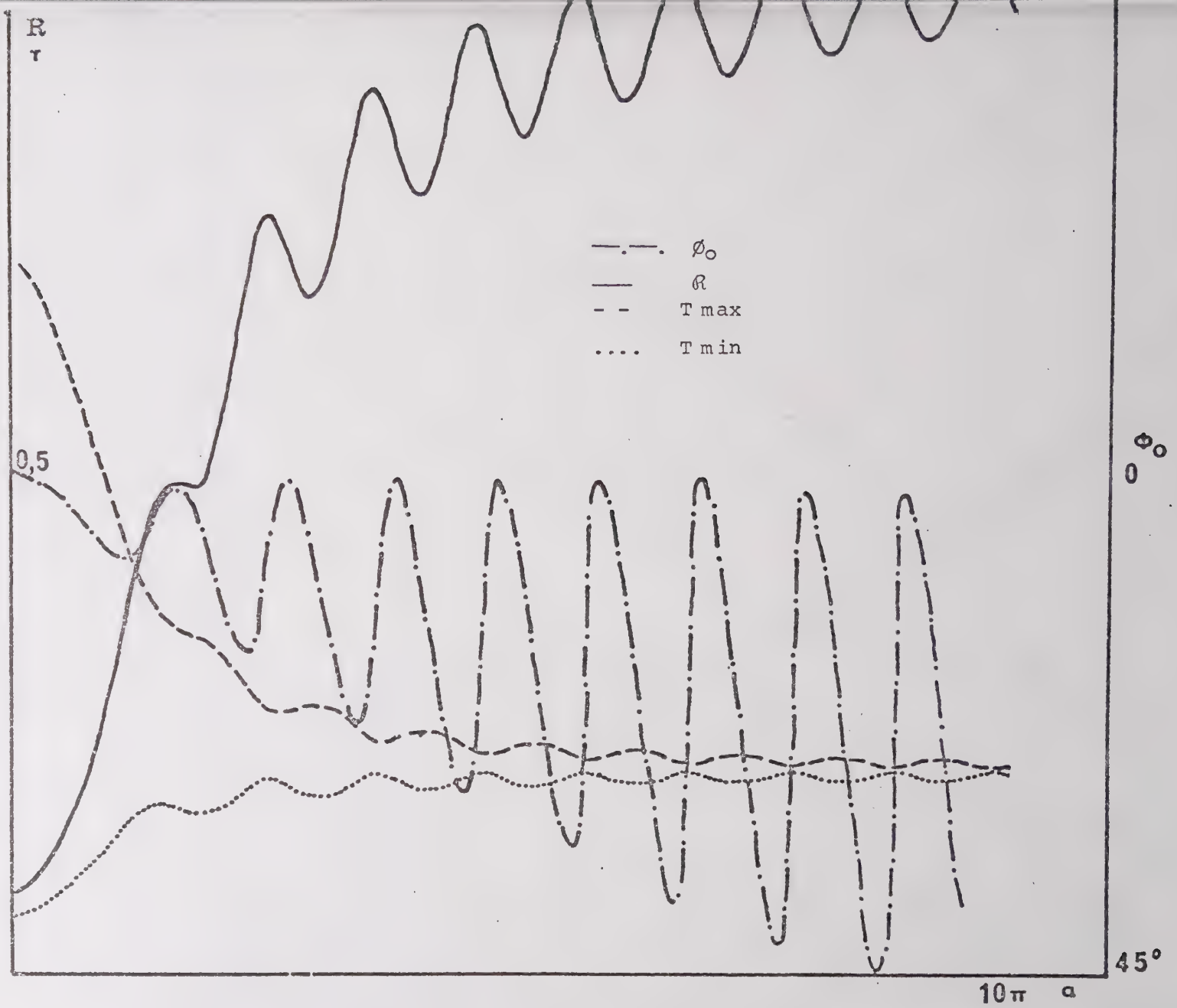


Fig. IV.3. Caractéristiques de l'intensité transmise par un cholestérique absorbant

$\Delta n = 0,05$

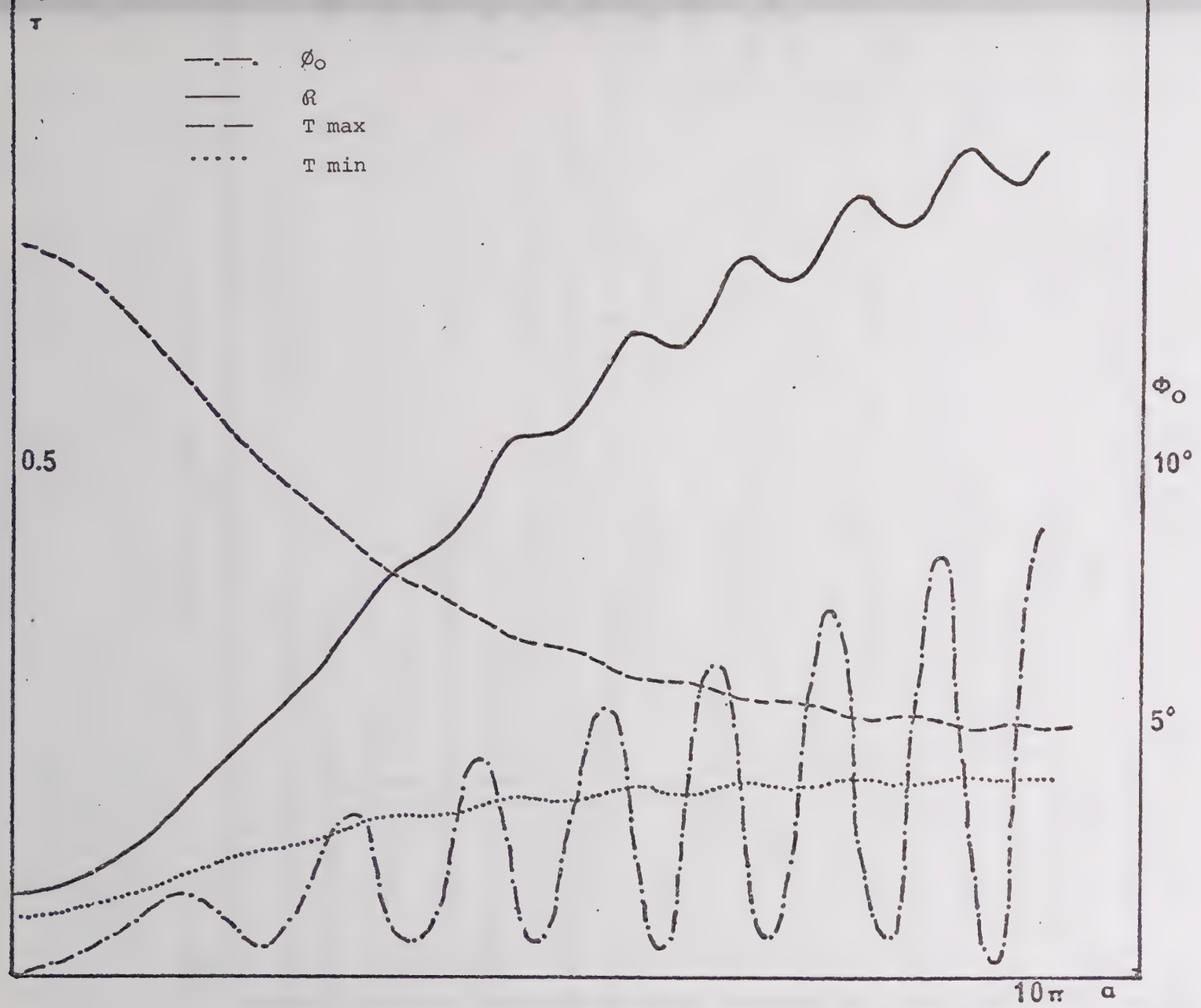


Fig. IV.3. Caractéristiques de l'intensité transmise par un cholestérique absorbant

$\Delta n = 0,14$

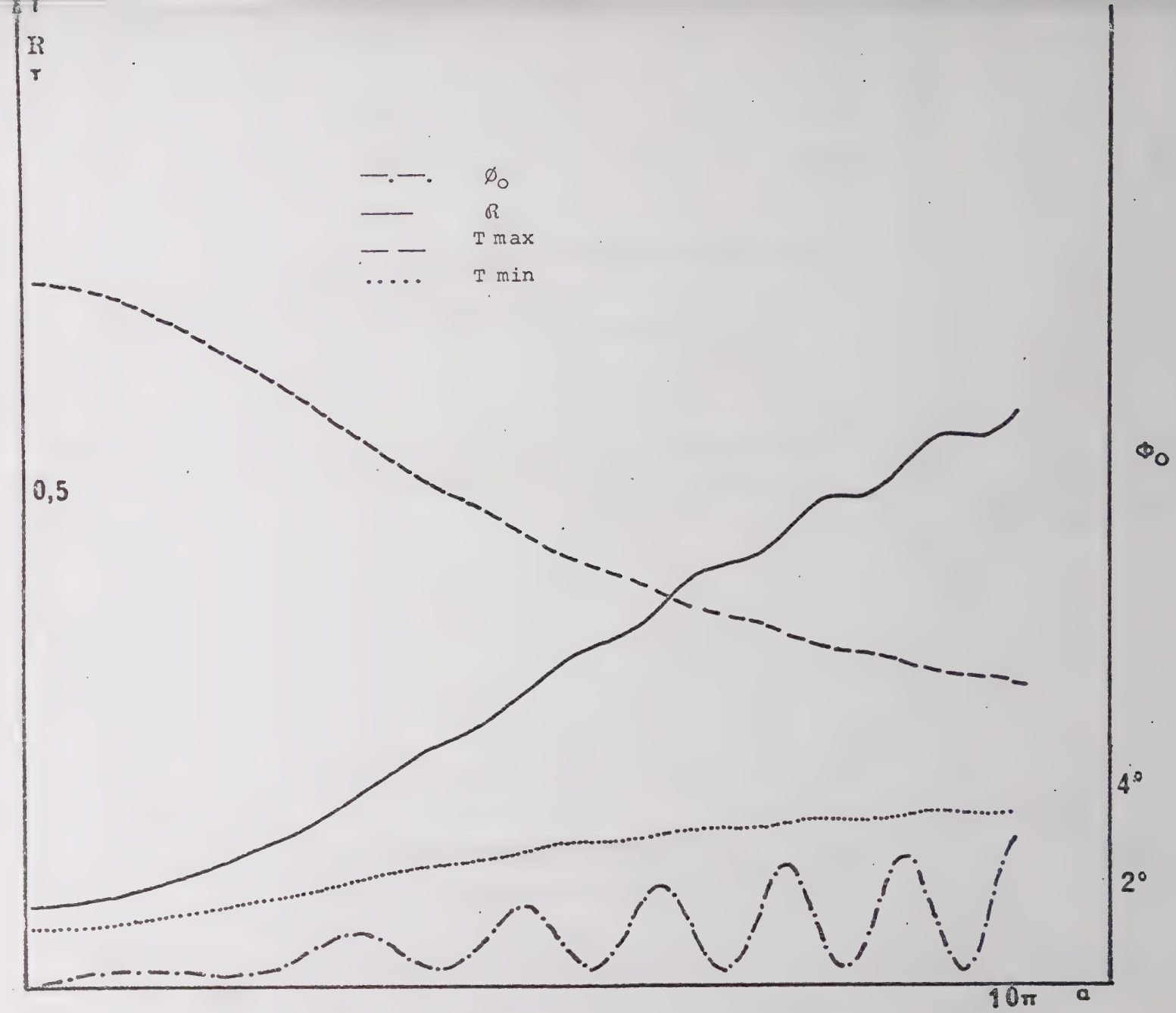


Fig. IV.3. Caractéristiques de l'intensité transmise par un cholestérique absorbant

$\Delta n = 0,246$

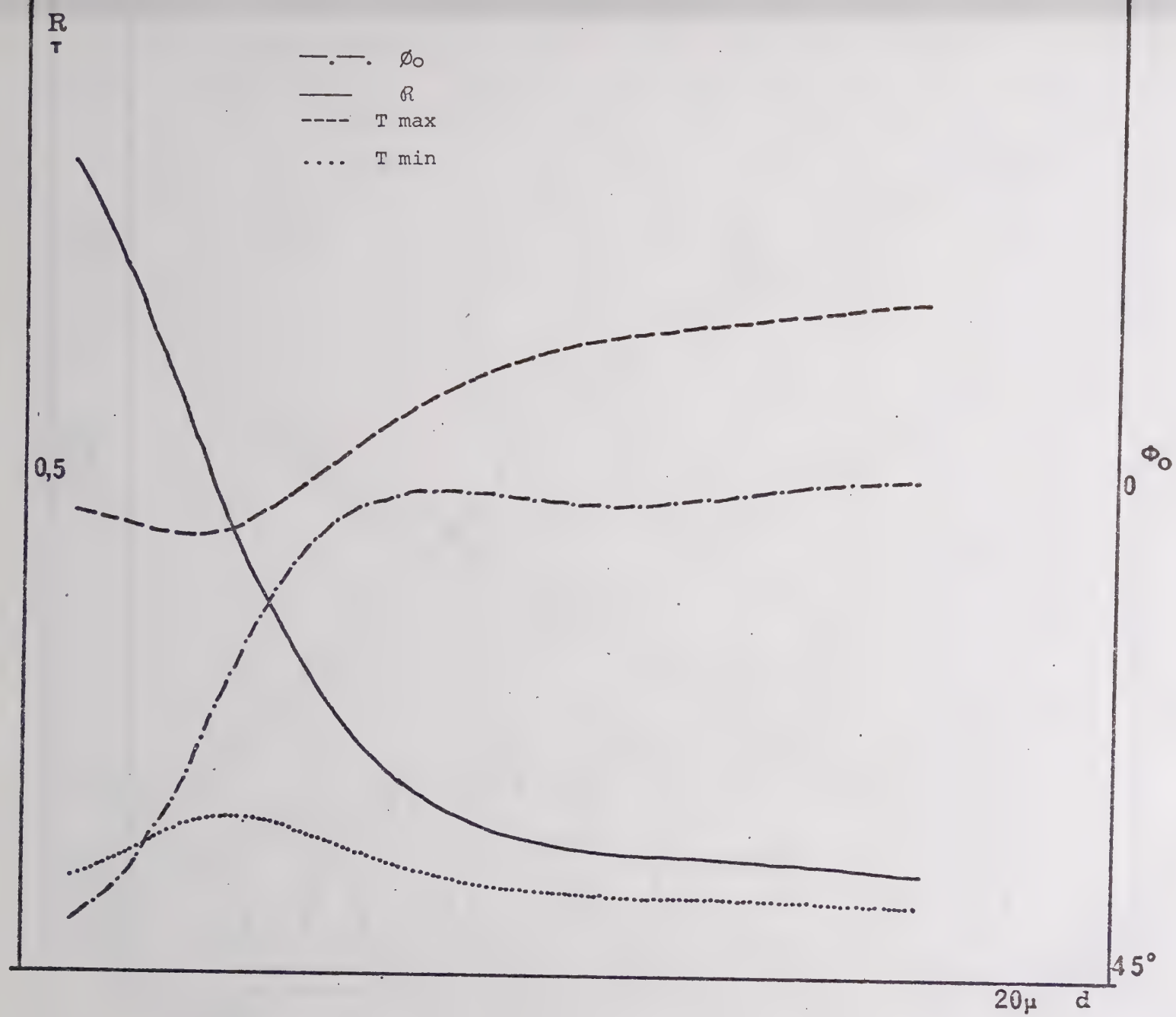


Fig. IV.4. Caractéristiques de l'intensité transmise par un nématique tordu absorbant $\Delta n = 0,05$.

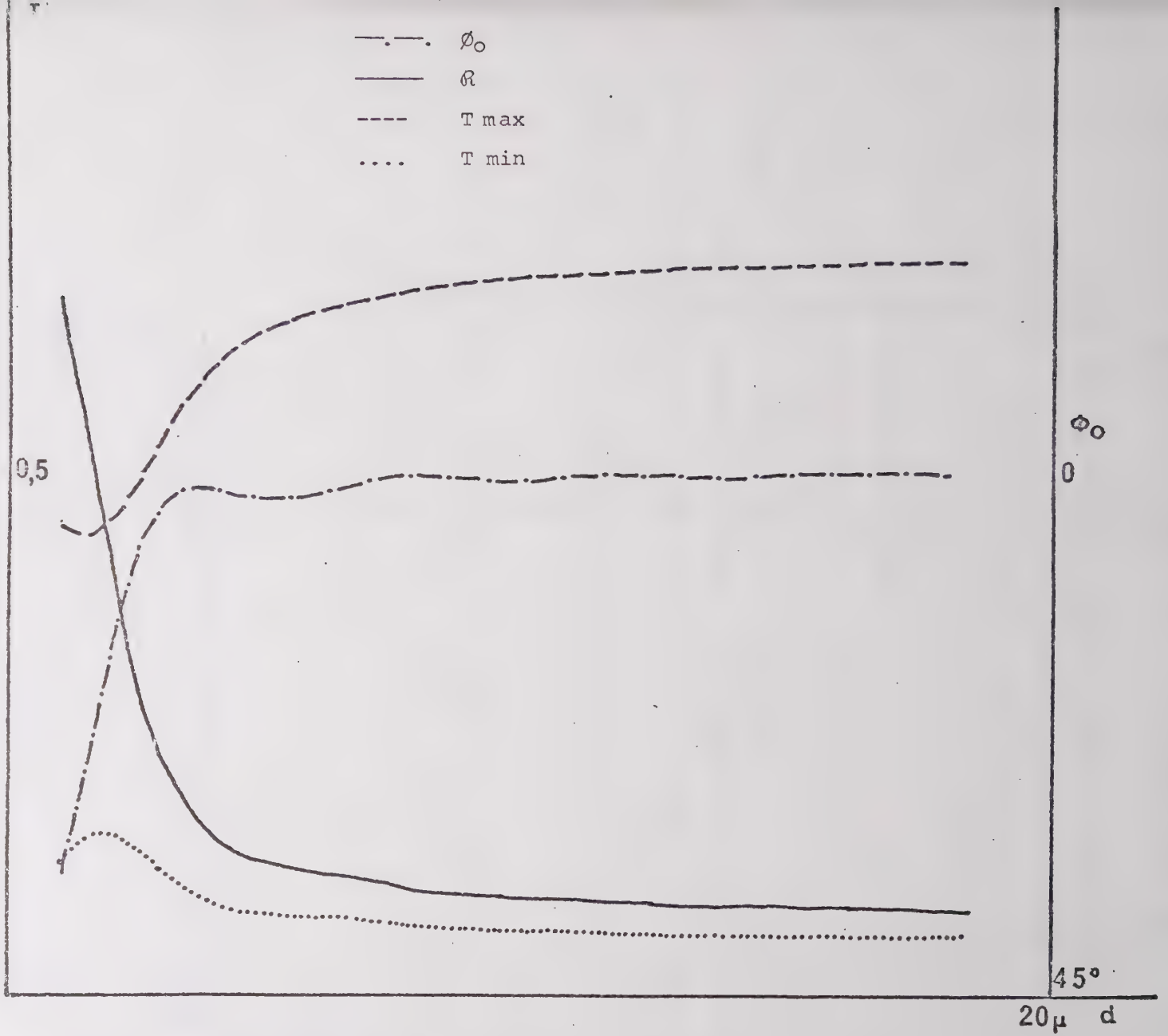


Fig. IV.4. Caractéristiques de l'intensité transmise par un nématique tordu absorbant $\Delta n = 0,14$.

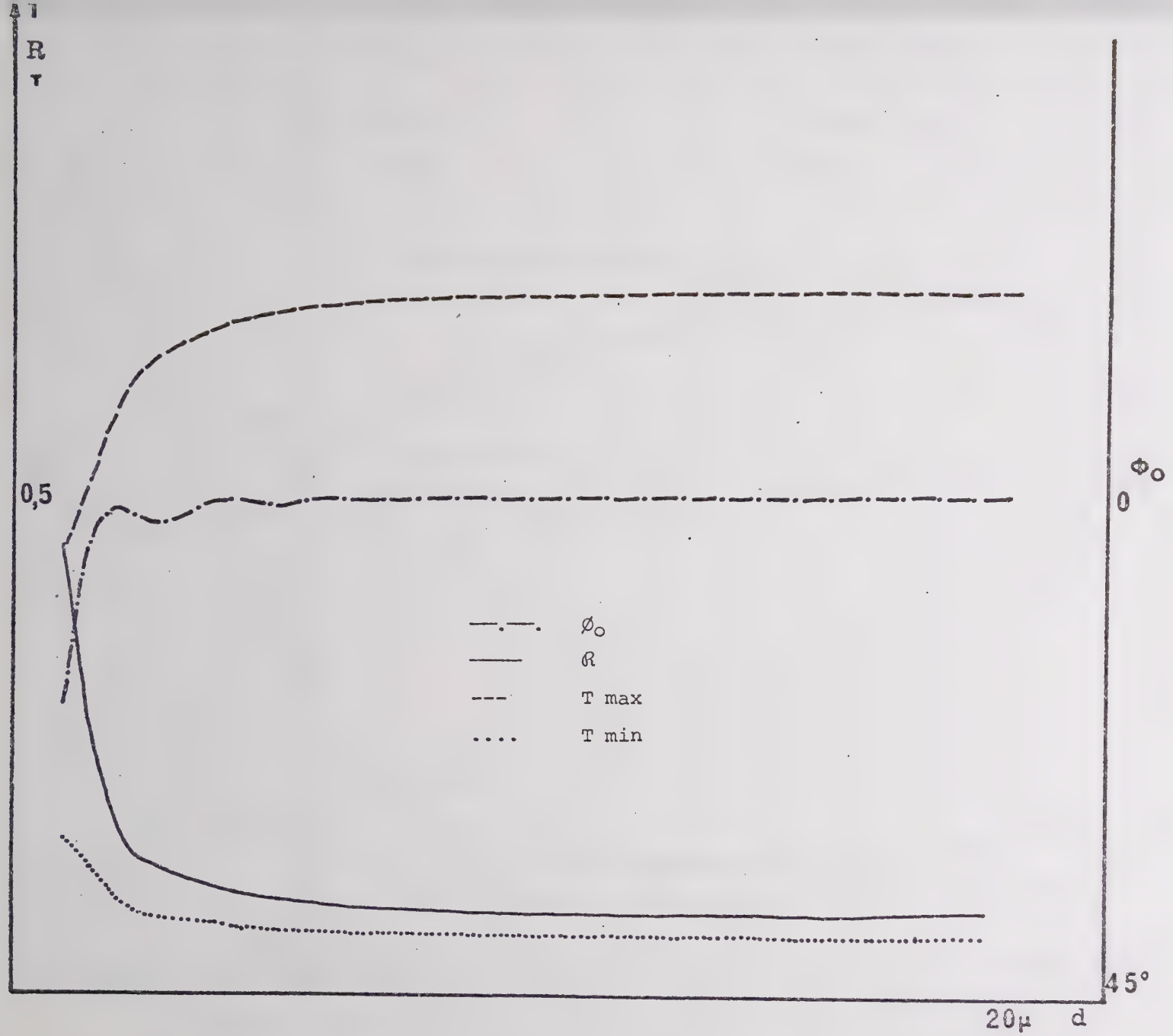


Fig. IV.4. Caractéristiques de l'intensité transmuse par un nématique tordu absorbant

$\Delta n = 0,246$

III.1.3. Vérification expérimentale

Nous avons cherché à vérifier expérimentalement les résultats obtenus dans le cas de nématiques tordus. Pour cela, nous avons utilisé un colorant (p-nitrophenylazo p'NN diméthylaniline), dissout dans un nématique. L'orientation sur les faces de la cuve a été réalisée par évaporasition oblique de SiO.

- Cas du MBBA (N-methoxybenzylidène p-nbutylaniline)

Pour ce nématique $\Delta n = 0{,}24$. Il faut donc une épaisseur de l'ordre du micron pour obtenir des caractéristiques franchement différentes du nématique ordinaire, conditions difficiles à réaliser expérimentalement. Pour cette raison, nous avons utilisé un autre nématique (ZLI de MERK).

- Cas de ZLI (mélange eutectique de

4 n pentyl trans trans bicyclohexyl 4' carbonitrite
4 n propyl trans trans bicyclohexyl 4' carbonitrite
4 n heptyl trans trans bicyclohexyl 4' carbonitrite

Pour ce nématique $\Delta n = 0{,}056$ ce qui nous donne un plus grand domaine d'étude. Une expérience sur le nématique ordinaire a permis de déterminer k_x et k_y (épaisseur $4{,}7\ \mu$). Pour un angle de torsion de 90°, le tableau IV.1. donne la comparaison entre valeurs théoriques et valeurs expérimentales (épaisseur $d = 4{,}4\ \mu$ $\lambda = 480$ mm).

III.2. Etat de polarisation de la lumière transmise

Il faut déterminer les parties réelles et imaginaires des relations (12) pour en déduire les composantes E_x et E_y en fonction de E_{xo} et E_{yo}. On obtient alors les composantes du champ sous la forme :

$$E_x = a_x e^{-J\psi x}$$

$$E_y = a_y e^{-j\psi y}$$

Soient $\psi = \psi_y - \psi_x$

$$\operatorname{tg} \theta = \frac{ay}{ax}$$

	Théorie	Expérience
ϕ_o	13°	20°
R	0,60	0,57
$\tau(o)$	0,32	0,32
$\tau(90)$	0,52	0,56
τ min.	0,30	0,28
τ Max.	0,54	0,58

TABLEAU IV. 1 - Comparaison entre valeurs théoriques et expériemntales des caractéristiques de la lumière transmise par un nématique tordu absorbant.

Dans le cas général, la lumière obtenue est elliptique. Les axes de l'ellipse font avec OX l'angle β tel que

$$\operatorname{tg} 2\beta = \cos\psi \operatorname{tg} 2\theta \quad (14)$$

L'ellipticité est donnée par :

$$\operatorname{tg} \epsilon = \left(\frac{1-\cos 2\beta \cos 2\theta - \sin 2\theta \sin 2\beta \cos\psi}{1+\cos 2\beta \cos 2\theta + \sin 2\theta \sin 2\beta \cos\psi} \right)^{1/2} \quad (15)$$

Avec les mêmes exemples numériques que précédemment, nous présentons quelques courbes tracées à l'ordinateur illustrant l'évolution de l'état de polarisation de la lumière dans le milieu cholestérique. Pour des raisons de clarté, seuls tg ϵ et β ont été tracés ; la connaissance de ψ précise l'orientation de l'ellipse et le sens de parcours. L'angle β est connu à $\pi/2$ près d'après la formule (14) ; nous l'avons représenté entre $-\frac{\pi}{4}$ et $+\pi/4$. L'ellipticité tg ϵ a été ramenée entre 0 et 1, en prenant son inverse quand elle sort de ce domaine. Ceci explique les discontinuités observées sur les courbes. Dans tous les cas, tg ϵ est représentée en traits discontinus (------) et β en traits continus (———)

III.2.1. Milieu non absorbant

Les figures IV.5. à IV. 7. montrent l'évolution de l'état de polarisation dans le cas d'une lumière rectiligne ou circulaire, et ceci en fonction de la biréfringence. On constate la périodicité du phénomène qui dépend de la biréfringence et du pas de l'hélice.

III.2.2. Milieu absorbant

Les figures IV.8. et IV.9. montrent l'évolution de l'état de polarisation pour un même milieu en fonction de l'état de polarisation initial.
On peut constater la disparition de la périodicité du phénomène ; d'autre part, l'ellipse de polarisation tend vers une limite. Cette limite ne dépend pas de l'état de polarisation initial mais est atteinte pour une épaisseur qui dépend de cet état. En particulier, pour un angle de torsion positif, la limite est atteinte plus rapidement pour la lumière circulaire droite (sens de rotation contraire à celui de la torsion).

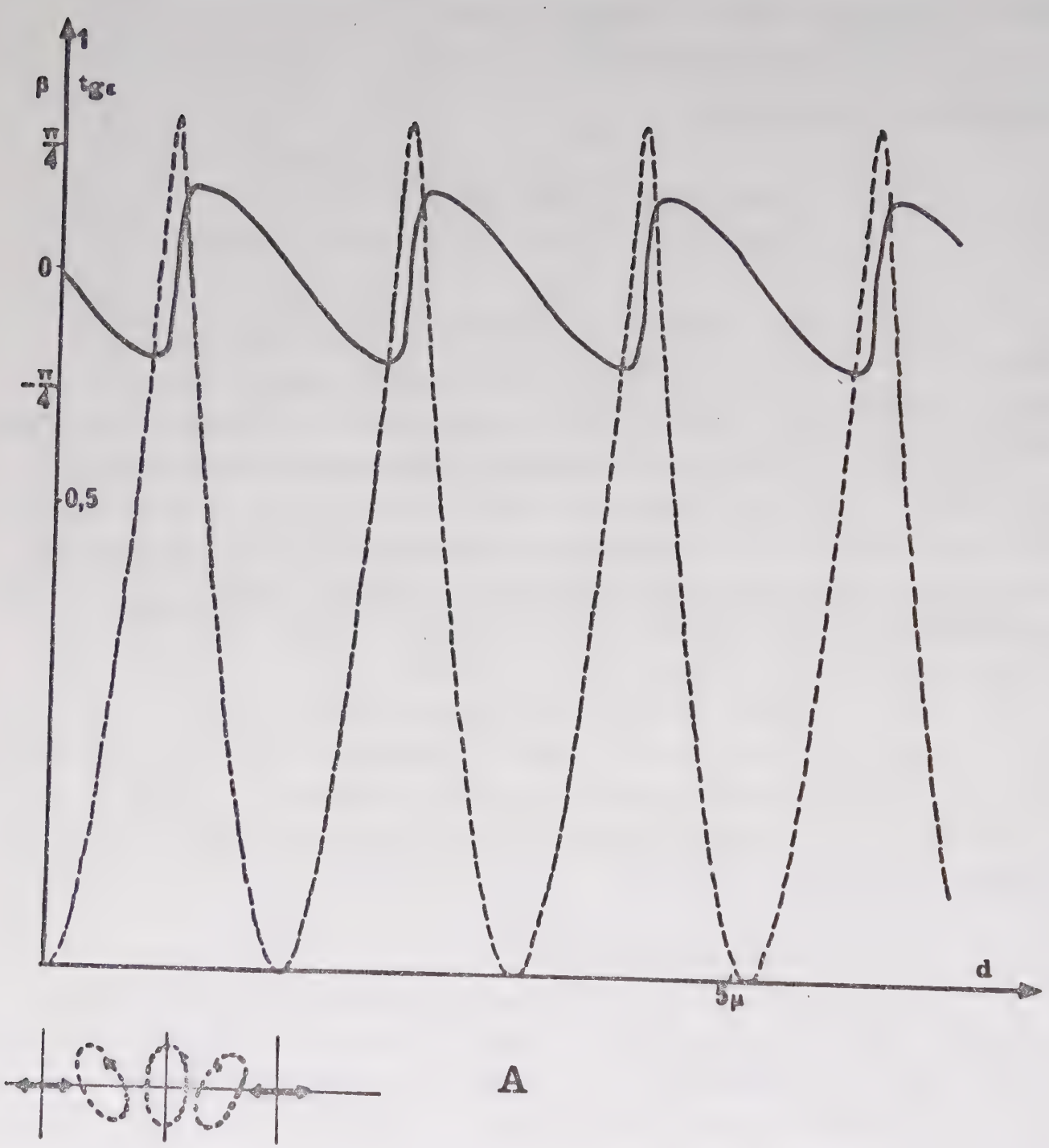


Fig. IV.5. Etat de polarisation de la lumière dans un cholestérique.
Lumière incidente rectiligne
d = 10 μ; $\alpha_T = 4\pi$; $\Delta n = 0,24$; $\lambda = 0,55\mu$

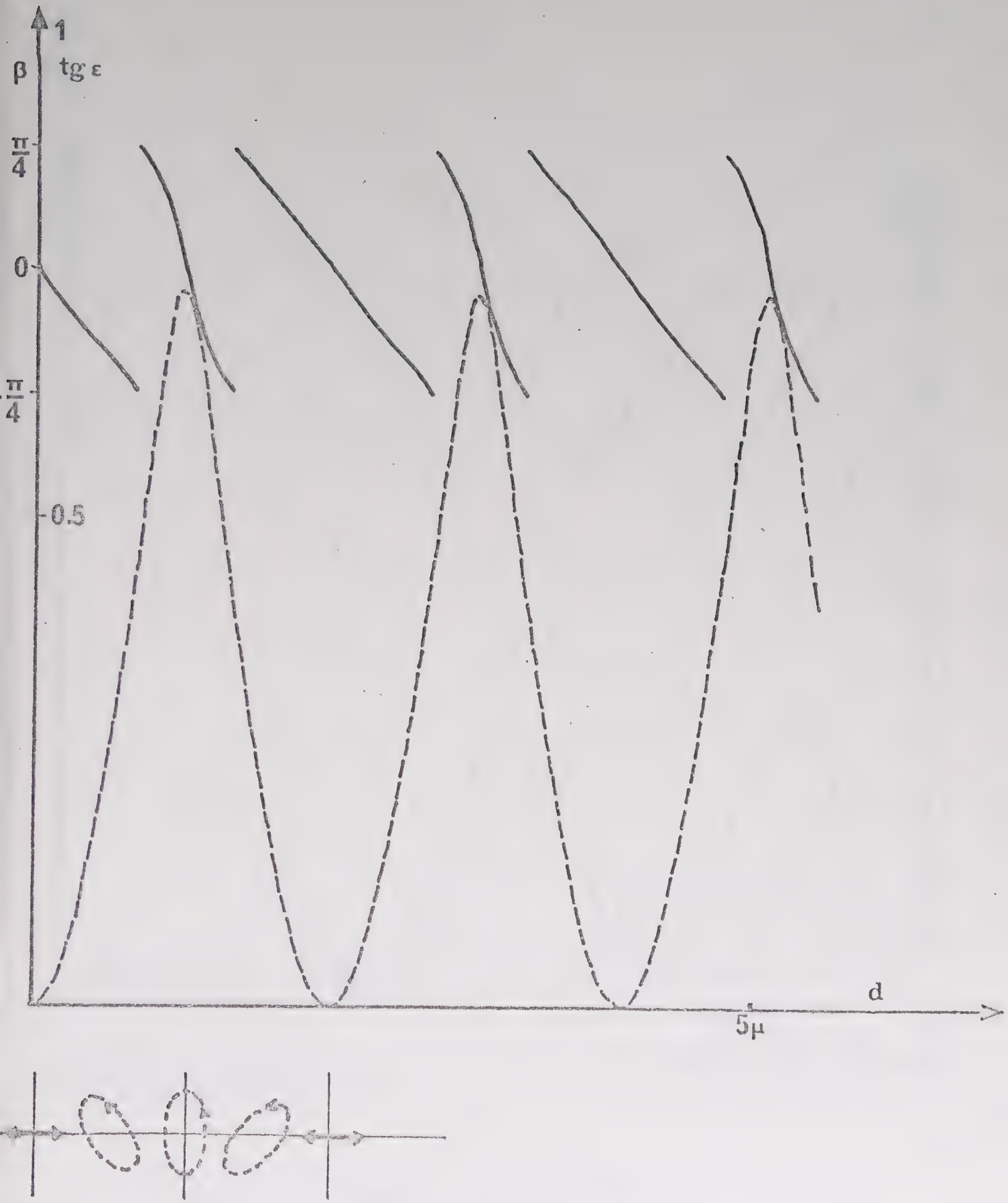


Fig. IV.5. Etat de polarisation de la lumière dans un cholestérique.
Lumière incidente rectiligne.
d = 10 μ ; α_T = 4 π ; Δn = 0,16 ; λ = 0,55 μ

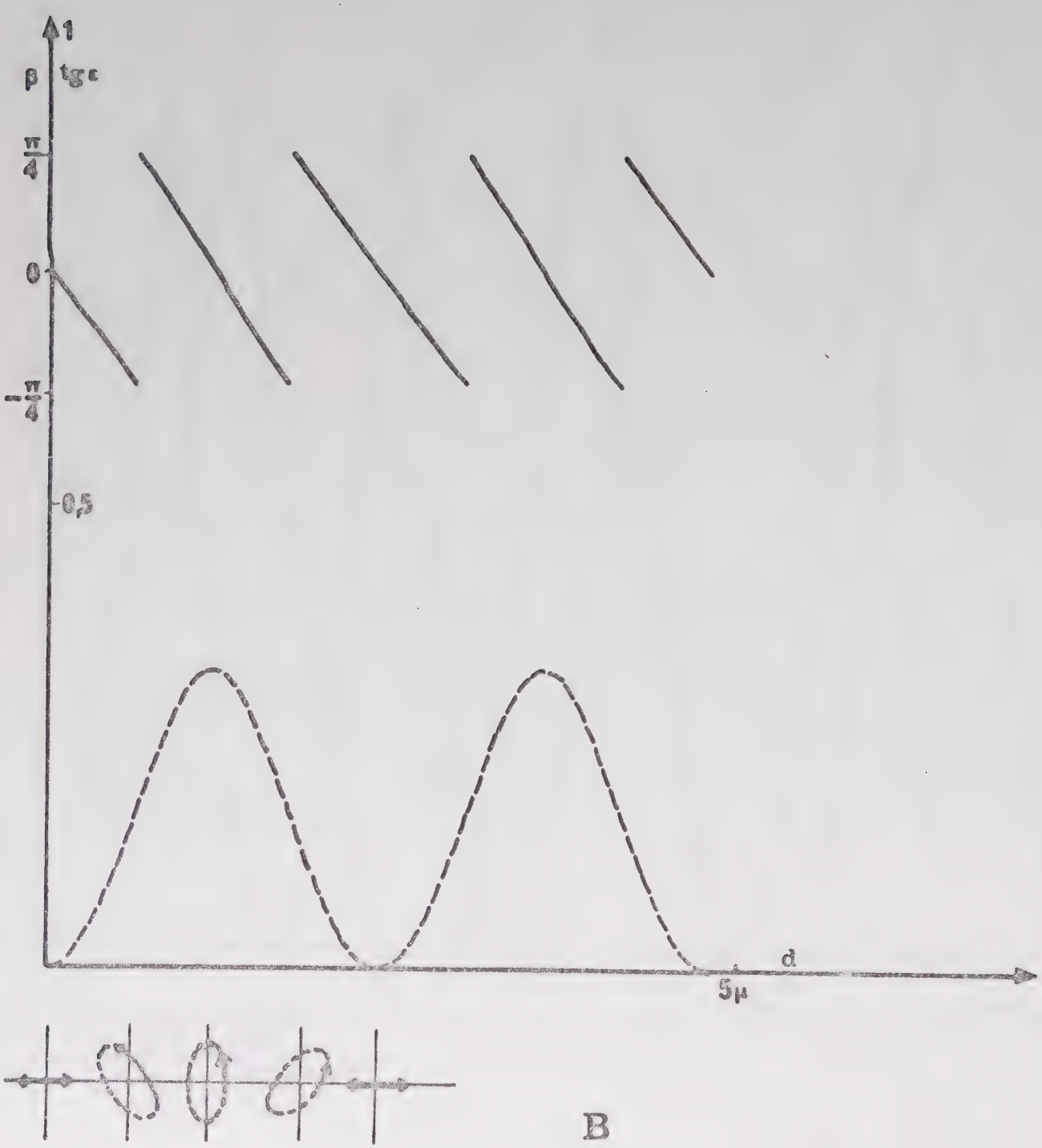


Fig. IV.5. Etat de polarisation de la lumière dans un cholestérique.
Lumière incidente rectiligne.
$d = 10\ \mu$; $\alpha_T = 4\ \pi$; $\Delta n = 0,07$; $\lambda = 0,55\ \mu$

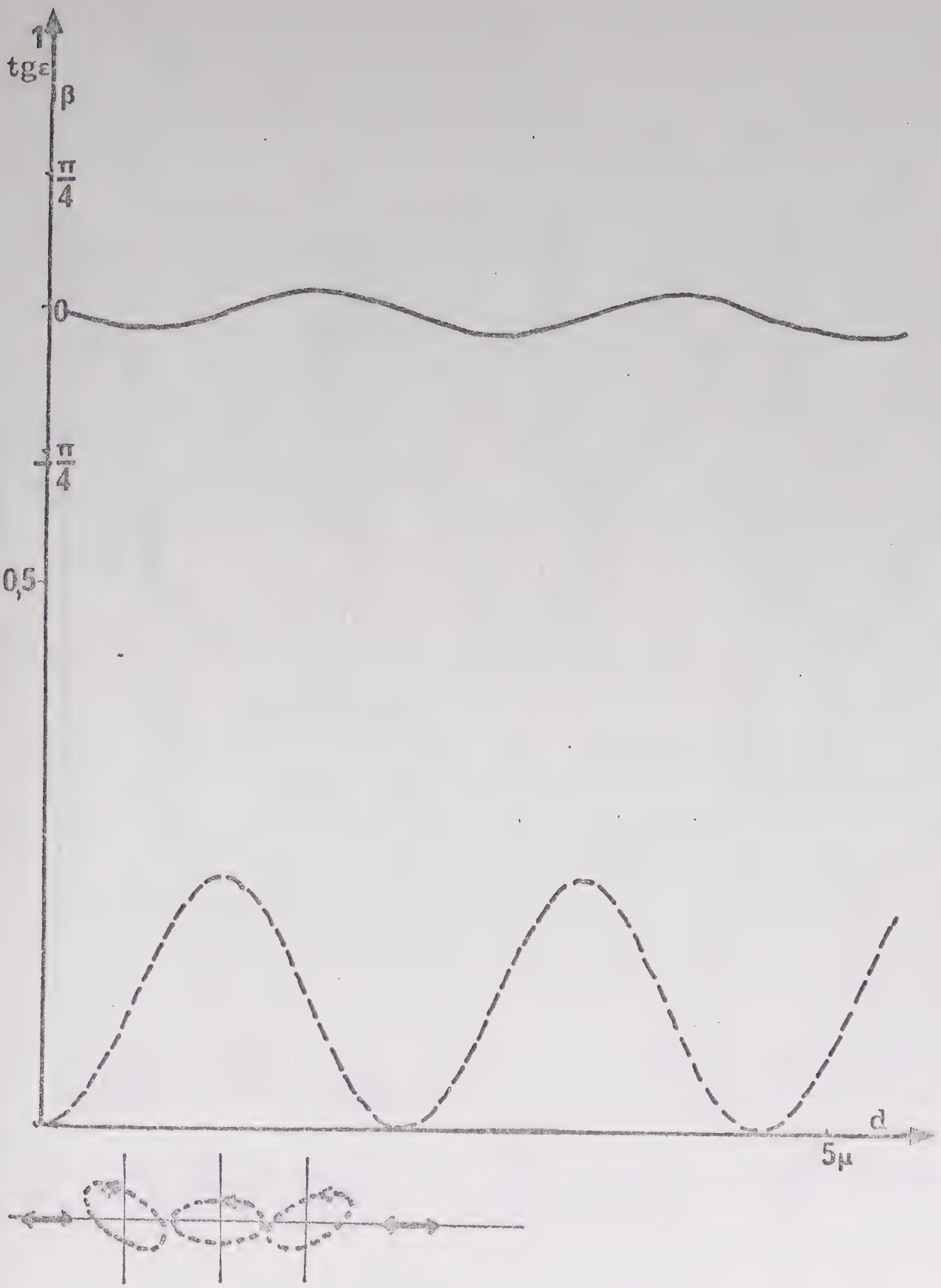


Fig. IV.6. Etat de polarisation de la lumière dans un cholestérique.
Lumière incidente rectiligne.
$d = 10\ \mu$; $\alpha_T = \pi$; $\Delta n = 0{,}24$; $\lambda = 0{,}55\ \mu$

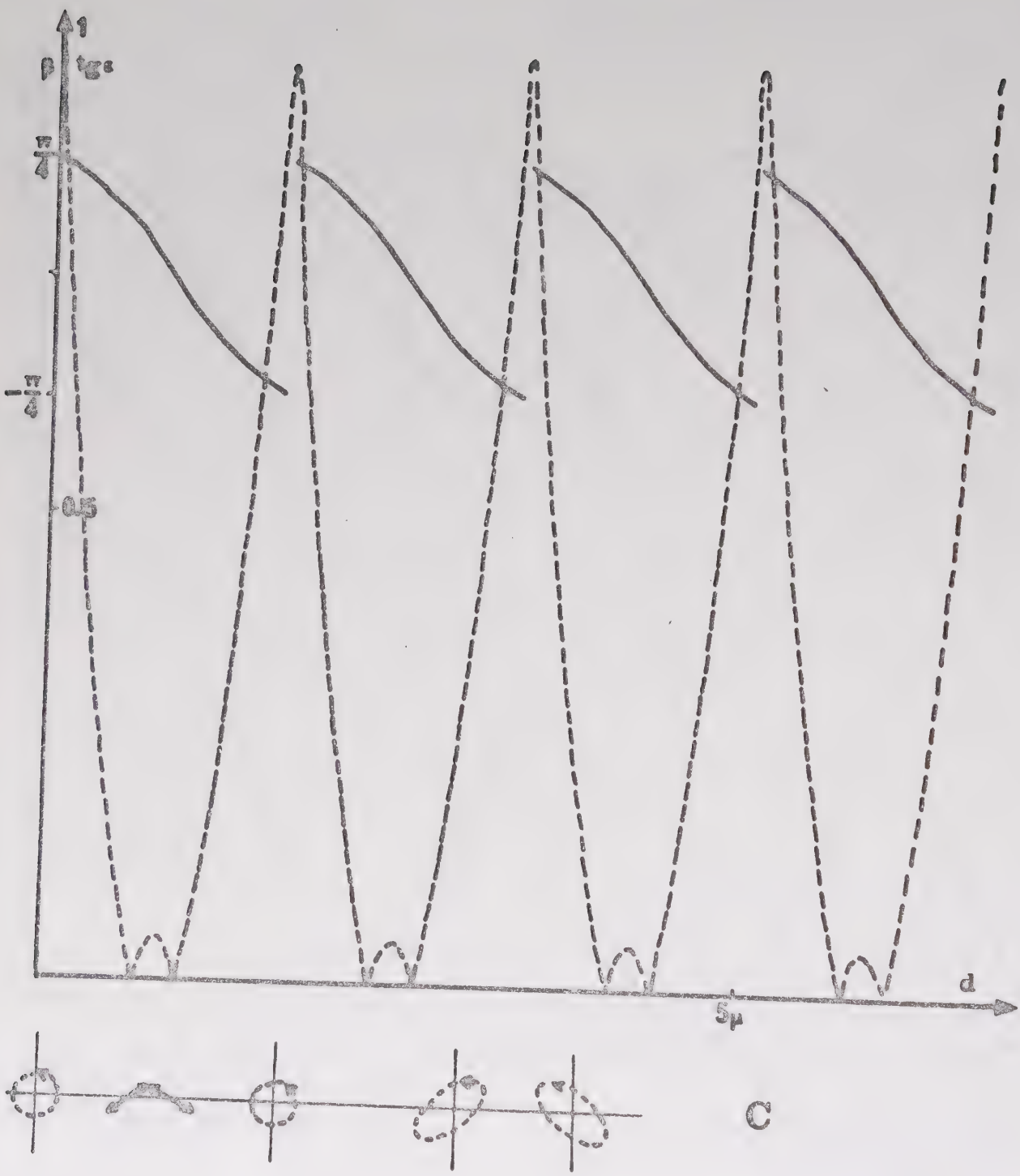


Fig. IV.7. Etat de polarisation de la lumière dans un cholestérique.
Lumière incidente circulaire.
$d = 10\ \mu$; $\alpha_T = 4\pi$; $\Delta n = 0{,}24$; $\lambda = 0{,}55\ \mu$

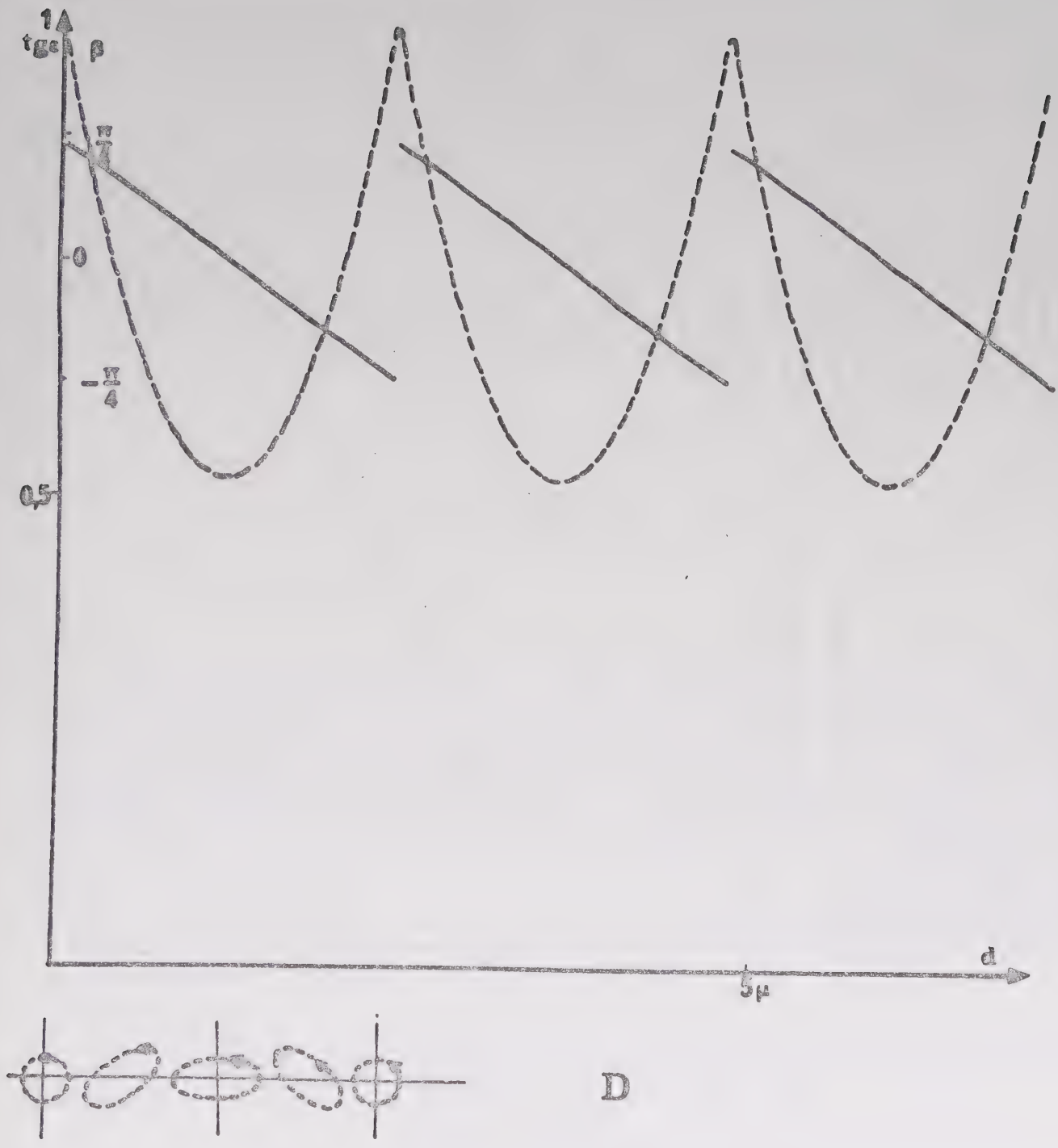


Fig. IV.7. Etat de polarisation de la lumière dans un cholestérique.
Lumière incidente circulaire.
$d = 10\ \mu$; $\alpha_T = 4\ \pi$; $\Delta n = 0,07$; $\lambda = 0,55\mu$

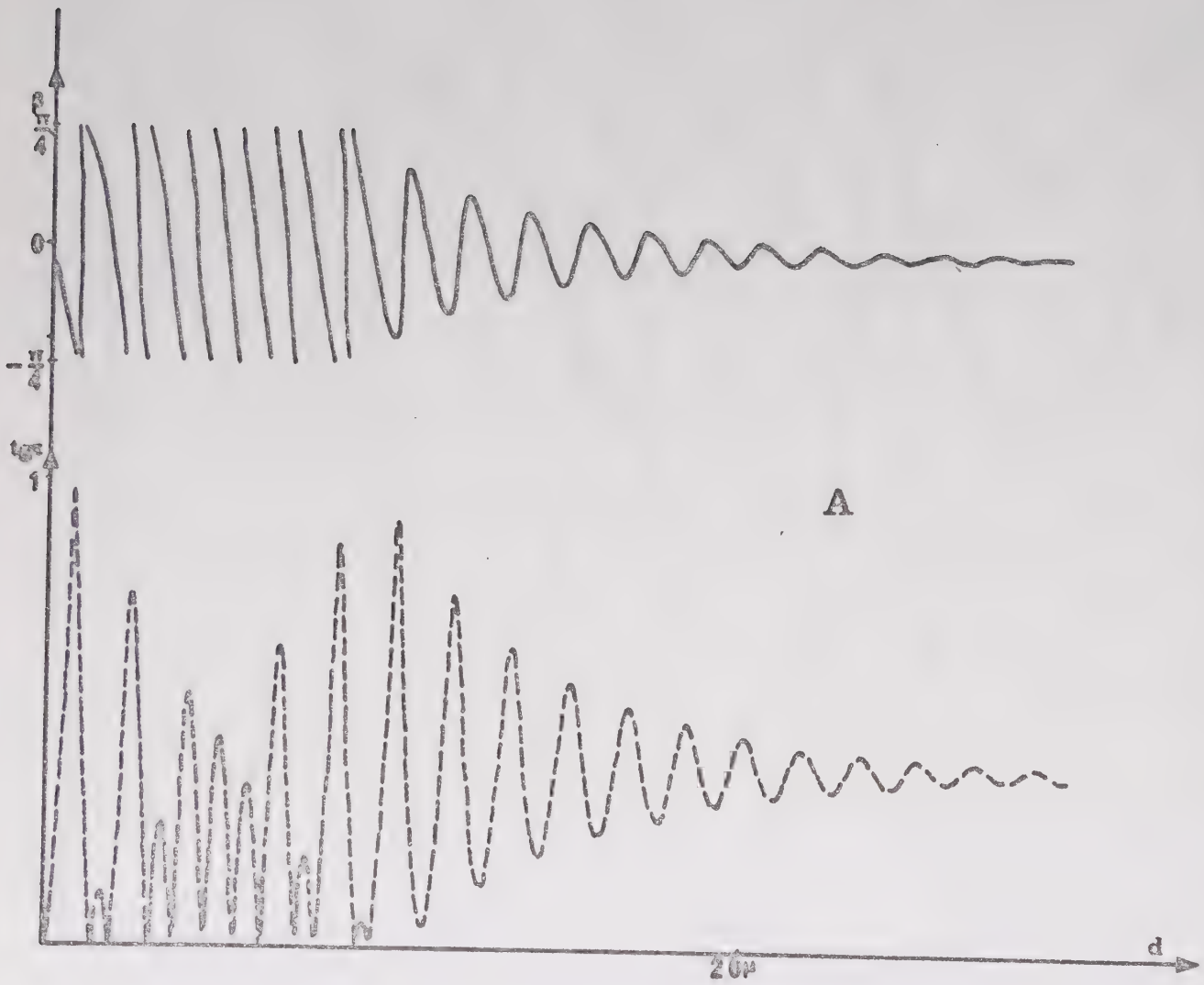


Fig. IV.8. Etat de polarisation de la lumière dans un cholestérique absorbant.

Lumière incidente ∥ Ox

d = 40 μ ; α_T = 16 π ; Δn = 0,24 ; λ = 0,55 μ

$k_x = 2{,}517\ 10^{-2}$ $k_y = 3{,}02\ 10^{-3}$

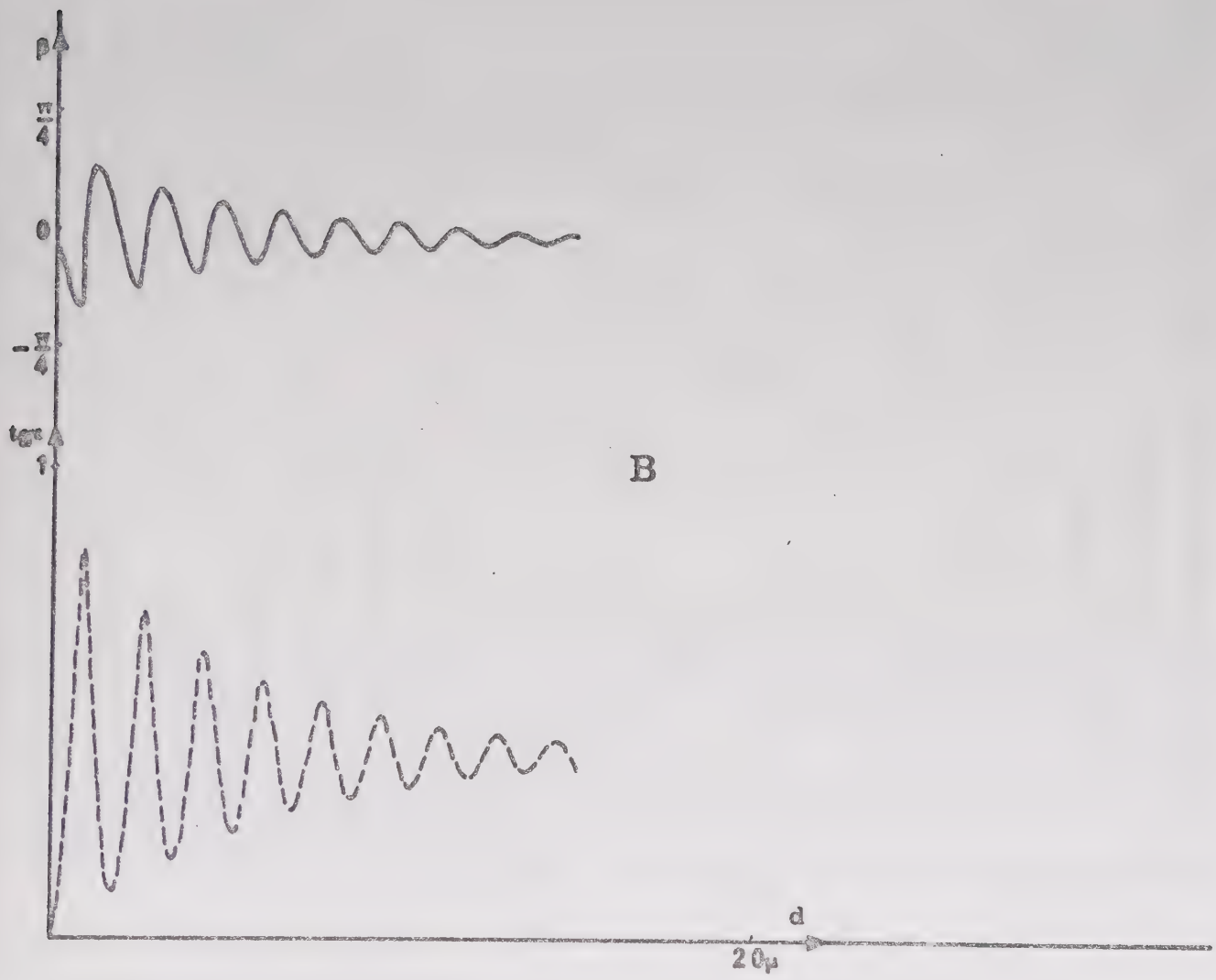


Fig. IV.8. Etat de polarisation de la lumière dans un cholestérique absorbant.

Lumière incidente ∥ Oy

$d = 40\ \mu$; $\alpha_T = 16\ \pi$; $\Delta n = 0{,}24$; $\lambda = 0{,}55\ \mu$

$k_x = 2{,}517\ 10^{-2}$ $\qquad$ $k_y = 3{,}02\ 10^{-3}$

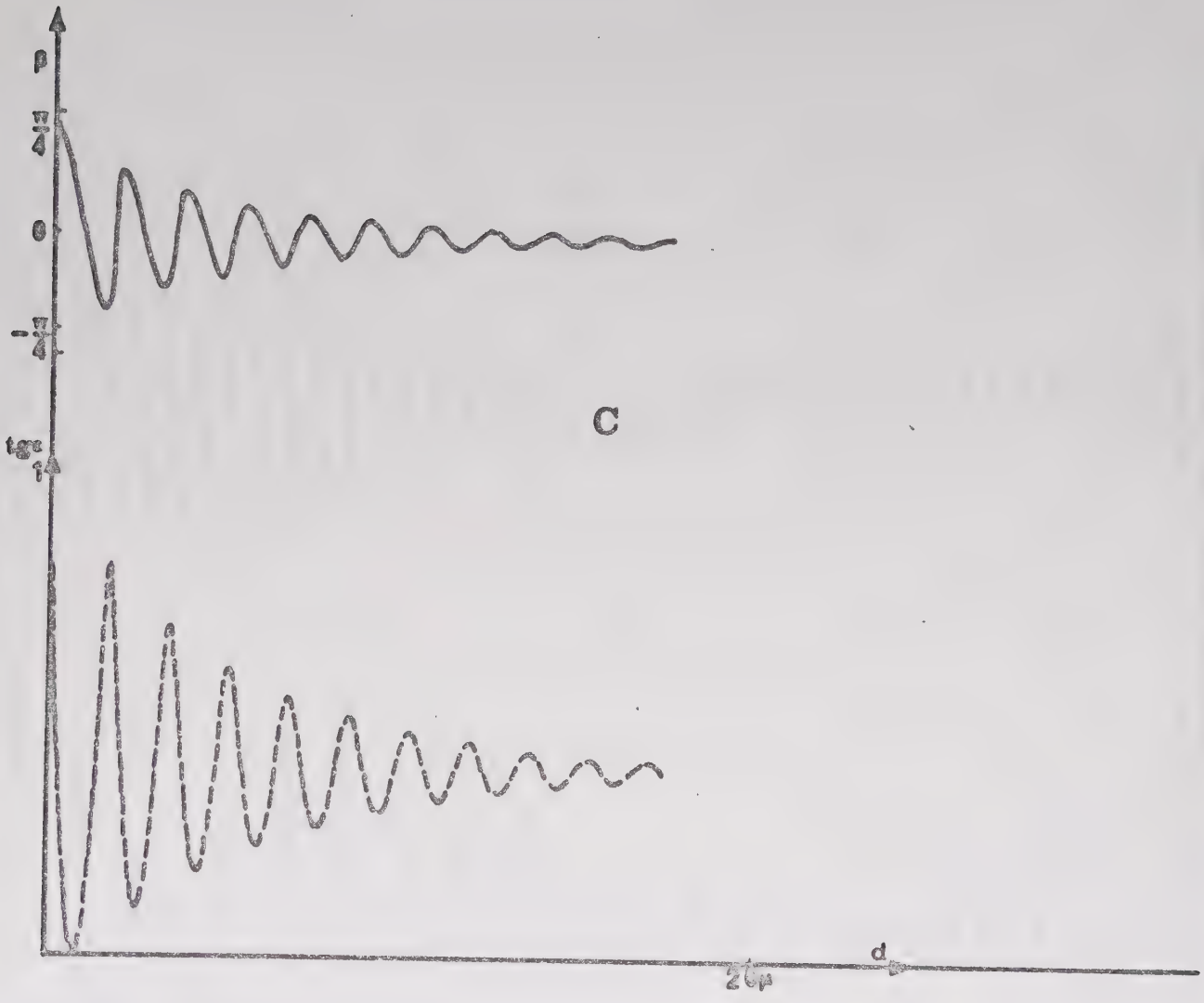


Fig. IV.9. Etat de polarisation de la lumière dans un cholestérique absorbant.

Lumière incidente droite

$d = 40\ \mu$; $\alpha_\Gamma = 16\ \pi$; $\Delta n = 0{,}24$; $\lambda = 0{,}55\ \mu$

$k_x = 2{,}517\ 10^{-2}$ $\qquad$ $k_y = 3{,}02\ 10^{-3}$

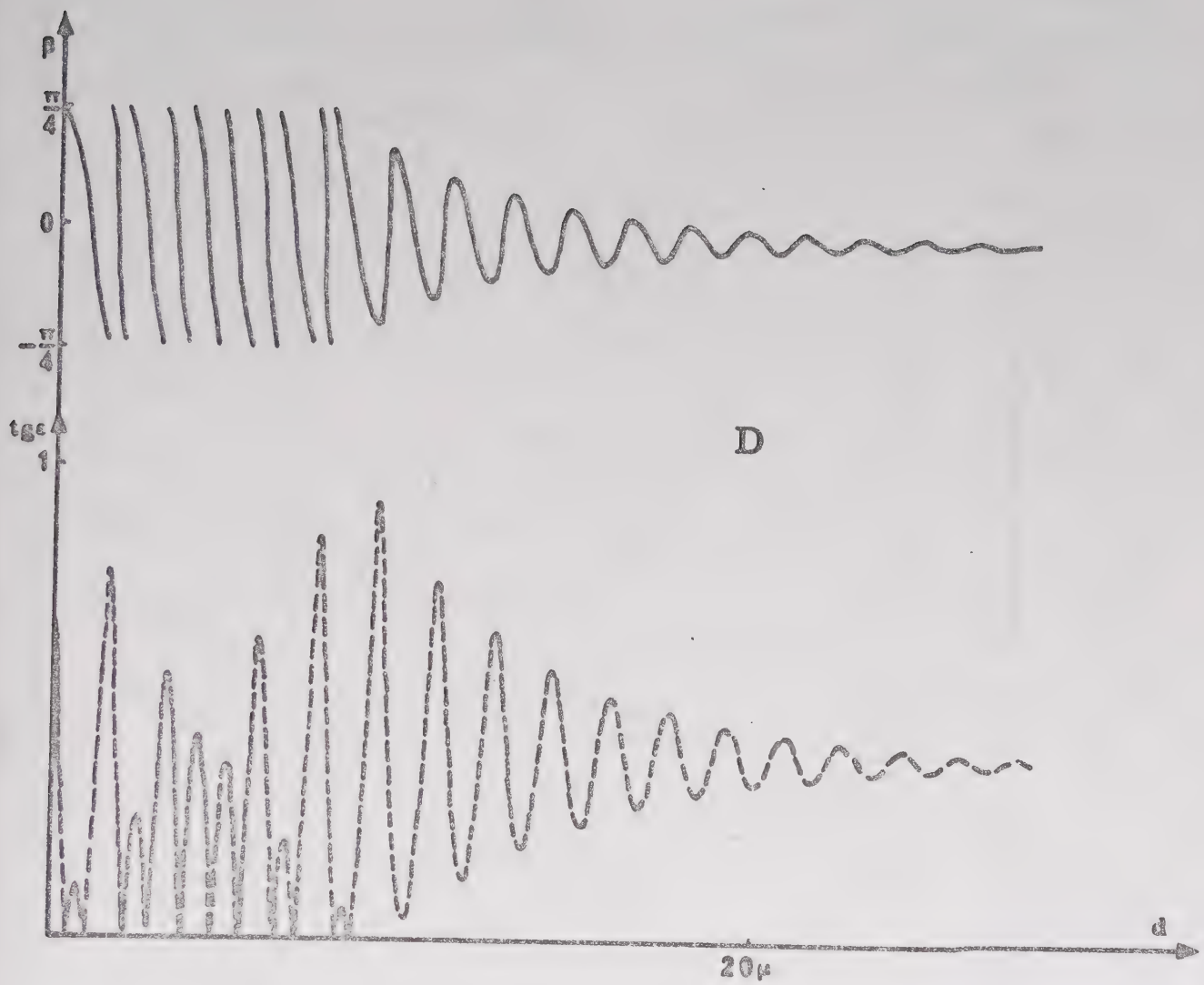


Fig. IV.9. Etat de polarisation de la lumière dans un cholestérique absorbant.

Lumière incidente circulaire gauche.

$d = 40\ \mu$; $\alpha_T = 16\ \pi$; $\Delta n = 0{,}24$; $\lambda = 0{,}55\ \mu$

$k_x = 2{,}517\ 10^{-2}$ $k_y = 3{,}02\ 10^{-3}$

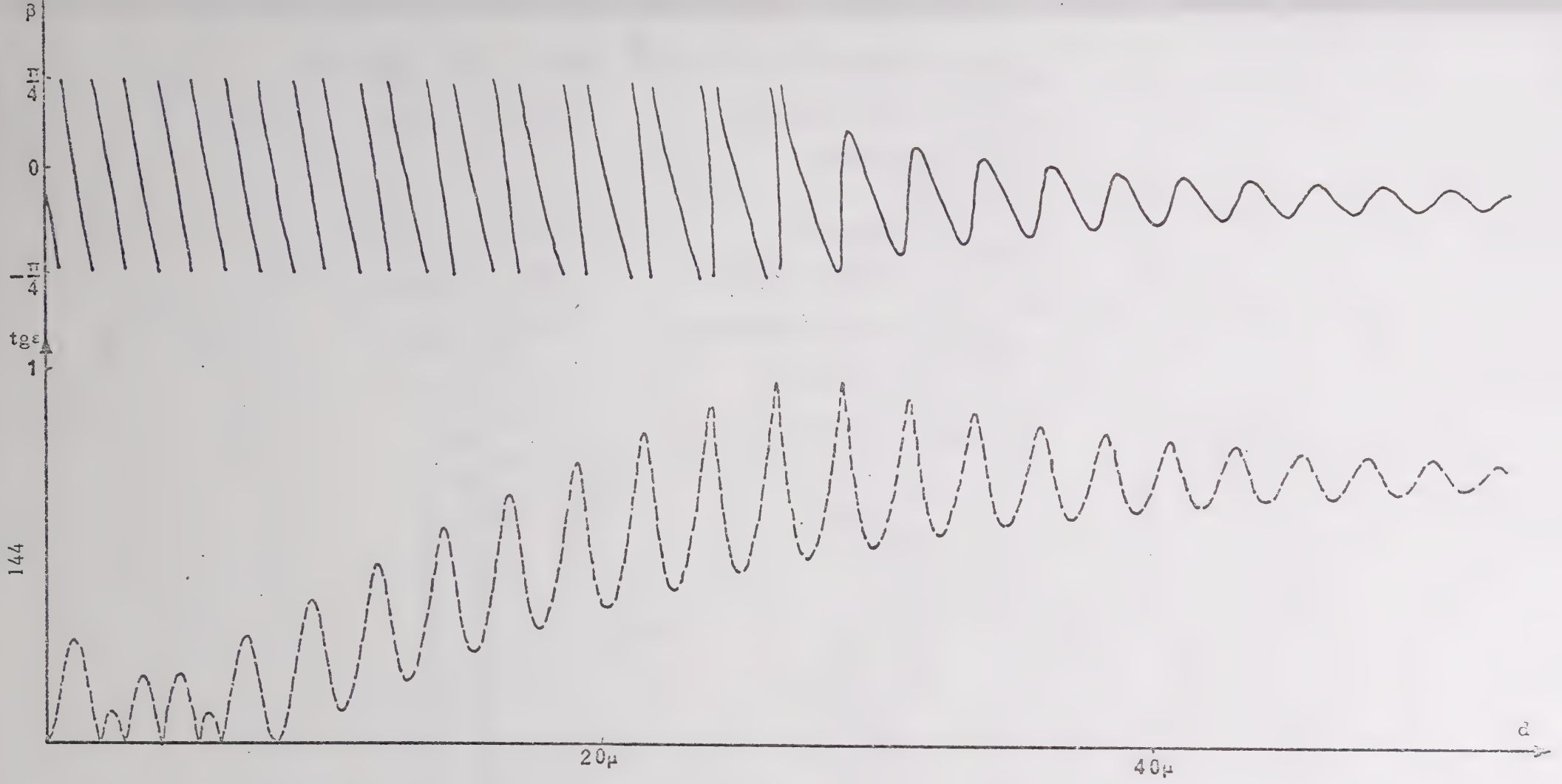


Fig. IV.10 Etat de polarisation de la lumière dans un cholestérique absorbant.
Lumière incidente ∥ O_x
$d = 40\ \mu$; $\alpha_T = 16\ \pi$; $\Delta n = 0{,}07$; $\lambda = 0{,}55\ \mu$
$k_x = 2{,}517\ 10^{-2}$ $k_y = 3{,}02\ 10^{-3}$

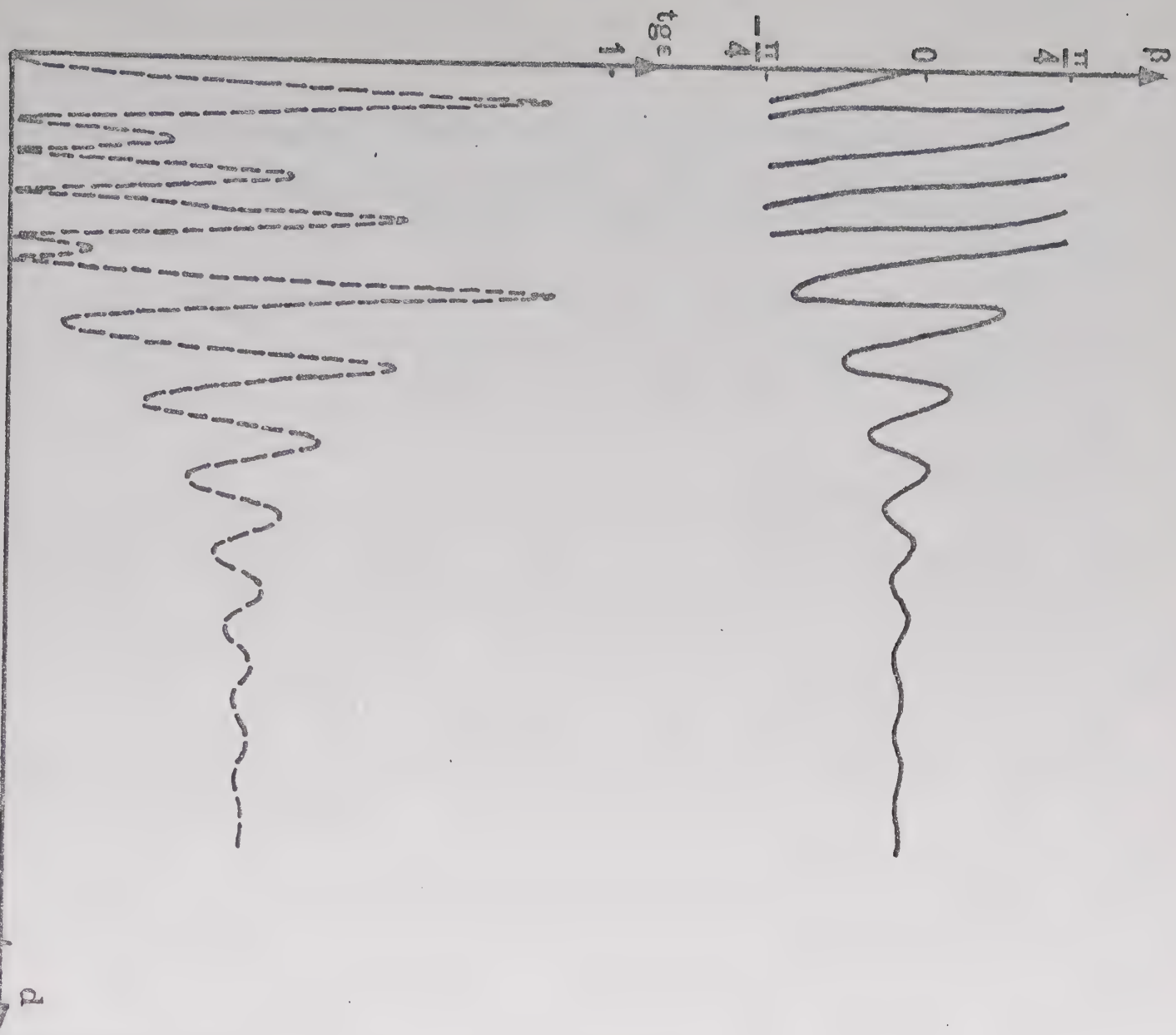


Fig. IV.11. Etat de polarisation de la lumière dans un cholestérique absorbant.

Lumière incidente ∥ O_X

$d = 40\ \mu$; $\alpha_T = 16\ \pi$; $\Delta n = 0{,}07$; $\lambda = 0{,}55\ \mu$

$k_x = 5{,}034\ 10^{-2}$ $\qquad$ $k_y = 6{,}04\ 10^{-3}$

Les figures IV.8. A et IV.10 montrent l'influence de la biréfringence. Quand elle diminue, la limite est atteinte pour une épaisseur plus grande. Cette limite est d'autre part fonction de la biréfringence.

Les figures IV.8. A et IV.11 montrent l'influence des indices k_x et k_y. Si l'absorption augmente, la limite est atteinte pour une épaisseur plus faible, et cette limite dépend peu de l'absorption.

CONCLUSION

Le calcul que nous avons présenté permet de résoudre complètement le problème de la transmission de la lumière polarisée dans un milieu nématique tordu ou cholestérique, absorbant ou non, et dans le cas où l'on se trouve loin de conditions de réflexion sélective. Les formules proposées permettent de calculer l'intensité transmise et l'état de polarisation en chaque point de milieu en fonctions de divers paramètres.

En particulier, nous avons montré que dans un milieu cholestérique absorbant, l'état de polarisation tend vers une limite qui dépend du cristal, mais non de l'état de polarisation initial.

IV. Applications aux pigments végétaux.

IV.1. Résultats expérimentaux

Nous avons étudié l'orientation de 4 pigments végétaux : chlorophylle a (Chla), chlorophylle b (Chlb), phéophytine a (Pha), méthylphéophorbide (MPha). Les deux cristaux liquides utilisés ont été MBBA et K15. Ils sont intéressants car ils présentent une phase nématique à la température ordinaire et n'altèrent pas la molécule de pigment ; ce dernier point a été vérifié par la stabilité du spectre d'absorption du pigment. Le premier nématique (MBBA) a l'avantage de s'orienter très facilement ; le deuxième (K15) a l'avantage d'avoir ses bandes d'absorption rejetées dans le proche U.V. (350 nm) ce qui permet d'étudier les bandes de Soret des pigments de façon plus complète. Signalons que des essais faits avec des mélanges de tolanes n'ont pas donné des résultats reproductibles.

Les figures IV.12. à IV.18. donnent des exemples de l'évolution de l'absorption des pigments dans le cristal liquide quand on fait tourner le plan de polarisation de la lumière incidente.

Les figures IV.19. à IV.24. montrent la linéarité entre $\tau(\phi)$ et $\cos^2\phi$ en accord avec la formule (2). Les longueurs d'onde choisies correspondent à la bande rouge, au maximum et aux épaulements de la bande de Soret. Pour la MBBA, l'absorption du solvant perturbe les résultats pour la bande de Soret et diminue la précision des mesures. Il faut en effet pour tous les spectres retrancher ce qui est dû au cristal liquide ; ceci est réalisé en enregistrant les spectres de cuves contenant le solvant pur. La reproductibilité des cuves, en particulier au niveau de leur épaisseur, conduit à une erreur de plusieurs pour cent dans les zones d'absorption. En particulier, seul le maximum principal peut être étudié pour Pha et Mpha, alors qu'avec K15, la bande de Soret est bien dégagée de la bande d'absorption du cristal liquide.

La figure IV.25. montre l'évolution de la position de la bande rouge pour la Chla dans la MBBA. Nous constatons un déplacement de 1 nm environ quand l'angle ϕ varie de 0 à 90°. Des résultats similaires sont constatés pour les autres pigments.

Pour la Chla dans la MBBA nous avons étudié l'évolution du dichroïsme en fonction de la température. Le tableau IV.2. montre la diminution de ce dichroïsme quand on élève la température. Les indices de réfraction des cristaux liquides utilisés doivent être connus en fonction de la longueur d'onde. Les résultats connus ont été utilisés pour le MBBA. Les indices de K15 ont été déterminés par la méthode du prisme ou par la méthode interférentielle avec une cellule à faces parallèles. Cette dernière méthode présente des difficultés d'interprétation qui ont été analysées (LAURENT 1976). Les résultats obtenus sont consignés dans la fig. IV.26. et IV.27 et le tableau IV.3.

Le paramètre d'ordre du cristal liquide S doit être également connu. Pour la MBBA nous avons utilisé les résultats publiés. Pour K15, S a été déterminé à partir du dichroïsme d'un colorant dissous. Le colorant orange red (OR) a été choisi car il a été prouvé qu'il permet une estimation correcte d'un degré d'ordre d'un cristal liquide. S se déduit de la formule 3 dans laquelle $\beta = 0$ (CONSTANT et al. 1976).

Il faut également tenir compte de la perturbation de l'ordre du cristal liquide par le pigment.Cet effet, se traduit en particulier par une diminution de la température de transition T_C entre nématique et liquide isotrope. En accord avec des résultats connus (KRONBERG et al. 1976) nous avons supposé que S ne dépend que de la température réduite $T = \frac{T-T_C}{T_C}$.

θ °C	F	$\frac{n\parallel}{n\perp}$	F'	S	β°
25	1,93	1,12	2,16	0,56	35,4
35	1,78	1,11	1,98	0,48	34,7
40	1,65	1,08	1,78	0,37	32,9
41	1,53	1,07	1,64	0,33	33,9
42	1 (isotrope)				

Tableau IV.2. Evolution du dichroïsme dans MBBA avec la température.

θ° C \ λ nm		435,8	546,1	578
22	n_e	1,794	1,737	1,728
	n_o	1,565	1,541	1,535
25	n_e	1,784	1,730	1,722
	n_o	1,567	1,542	1,536
30	n_e	1,766	1,713	1,704
	n_o	1,571	1,547	1,539
33	n_e	1,744	1,696	1,688
	n_o	1,576	1,551	1,545
34	n_e	1,740	1,692	1,682
	n_o	1,580	1,553	1,548

Tableau IV.3. Indices de réfraction de K 15 en fonction de la température et de la longueur d'onde.

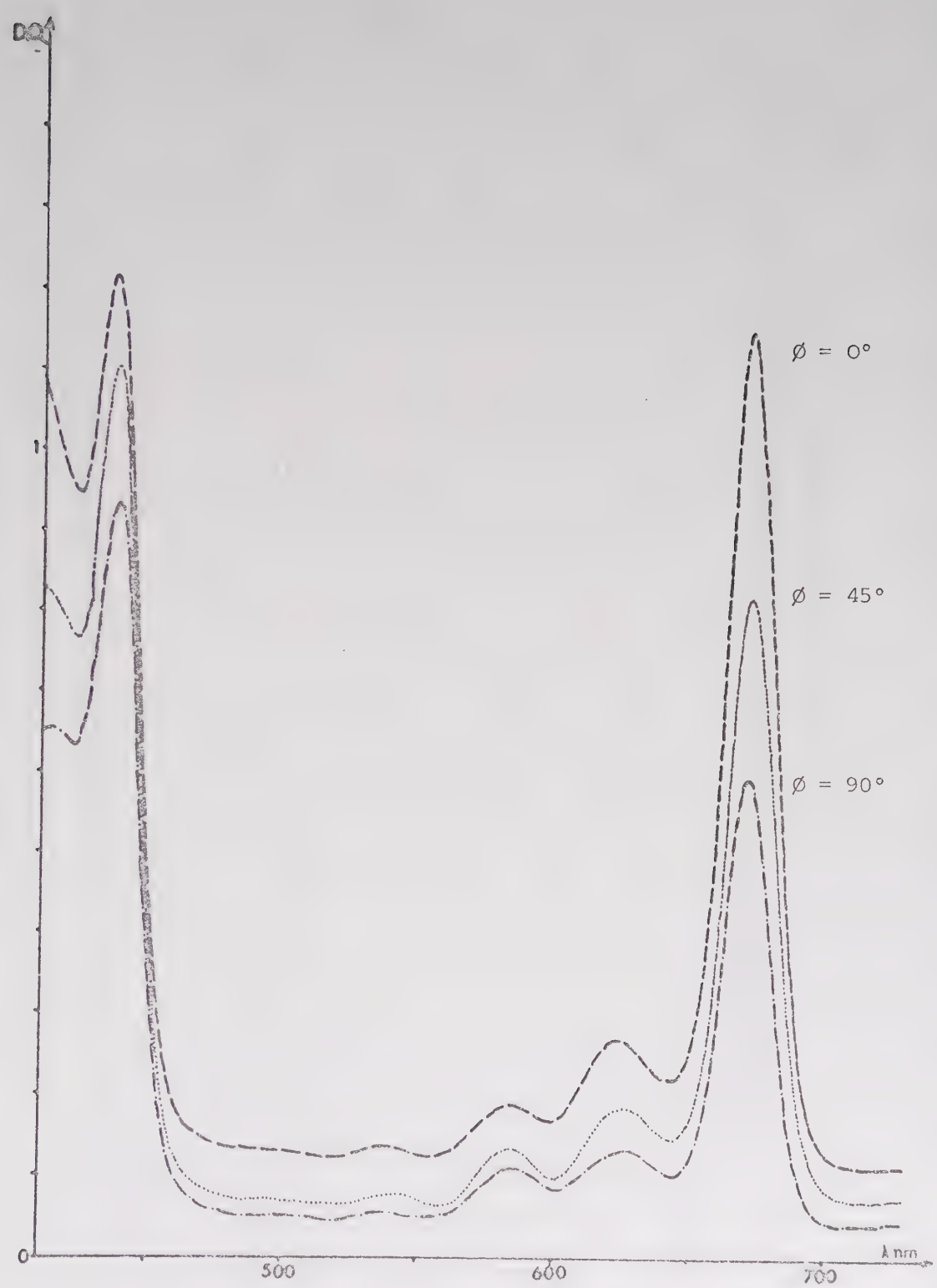


Fig. IV.12. Evolution du spectre d'absorption de Chla dans MBBA en lumière polarisée.

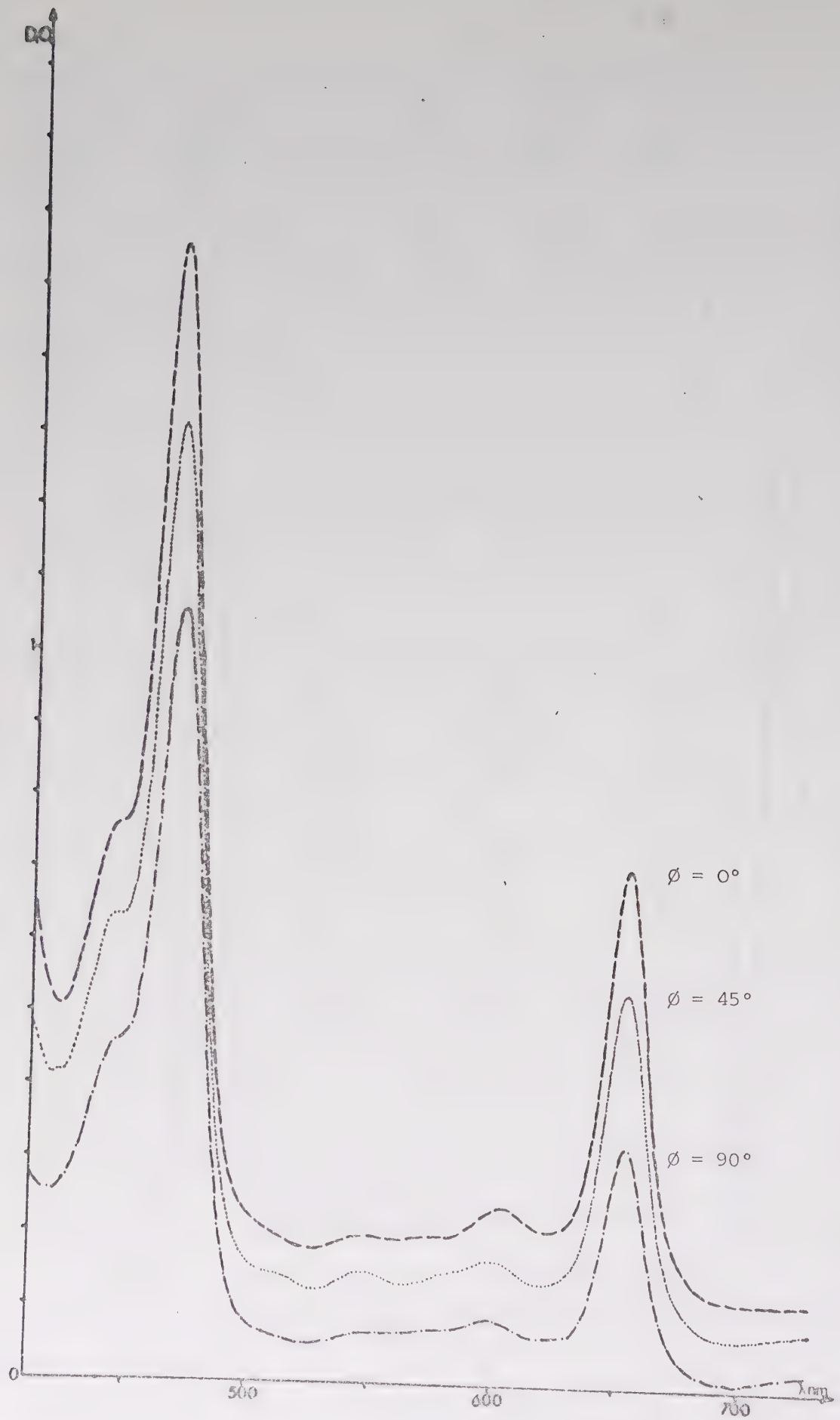


Fig. IV.13. Evolution du spectre d'absorption de Chlb dans MBBA en lumière polarisée

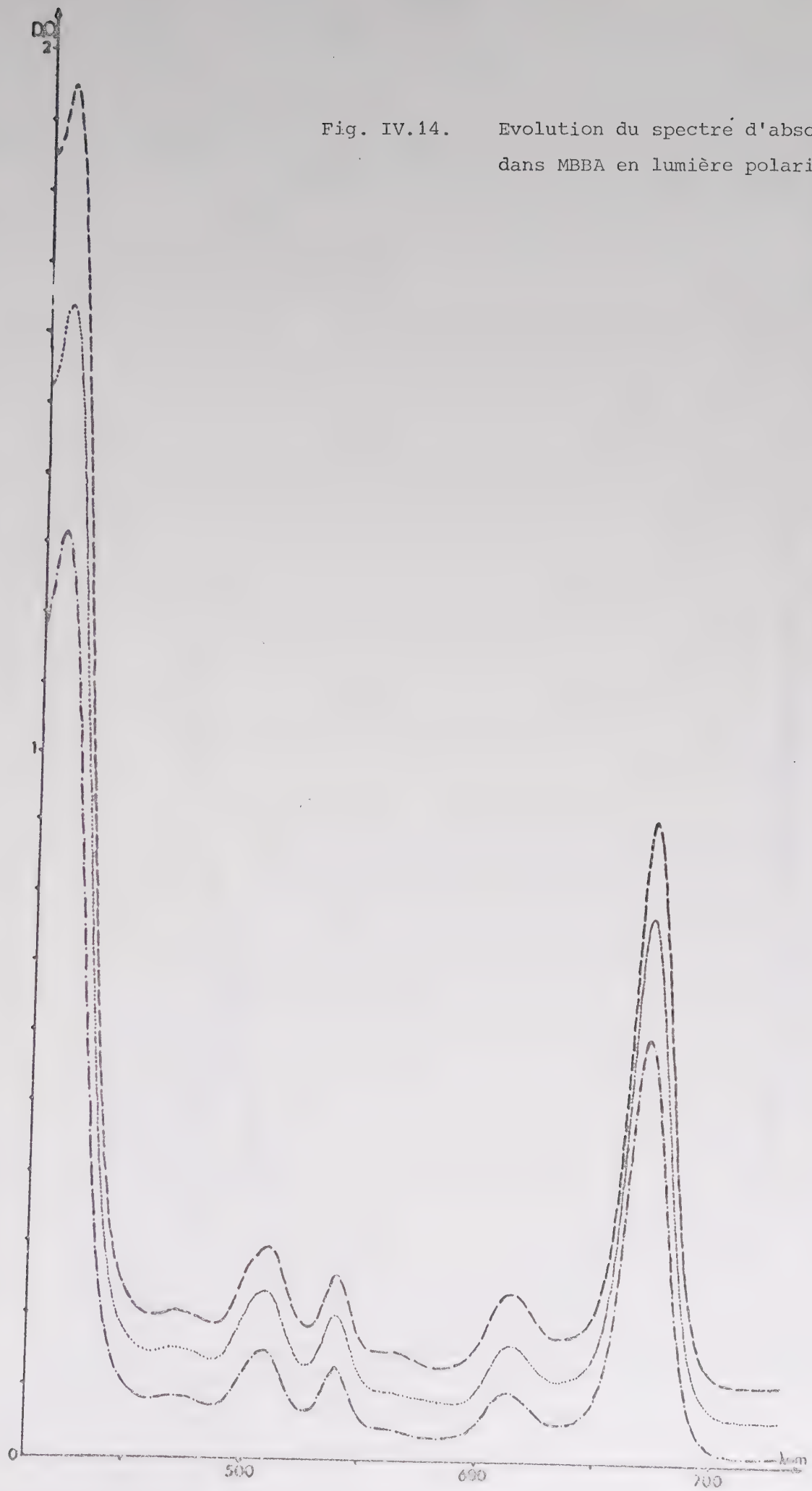


Fig. IV.14. Evolution du spectre d'absorption de Pha dans MBBA en lumière polarisée.

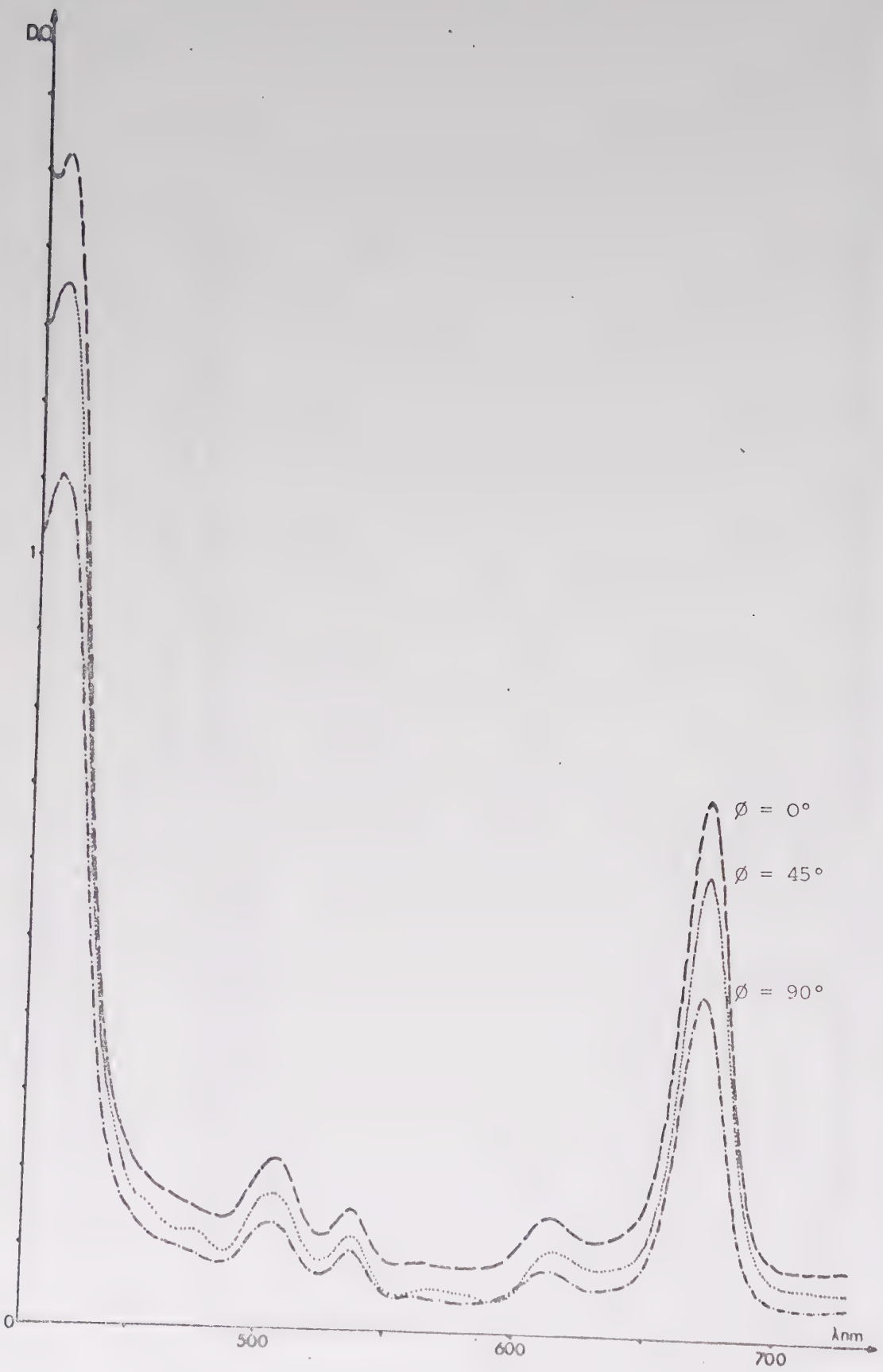


Fig. IV.15. Evolution du spectre d'absorption de MPha dans MBBA en lumière polarisée.

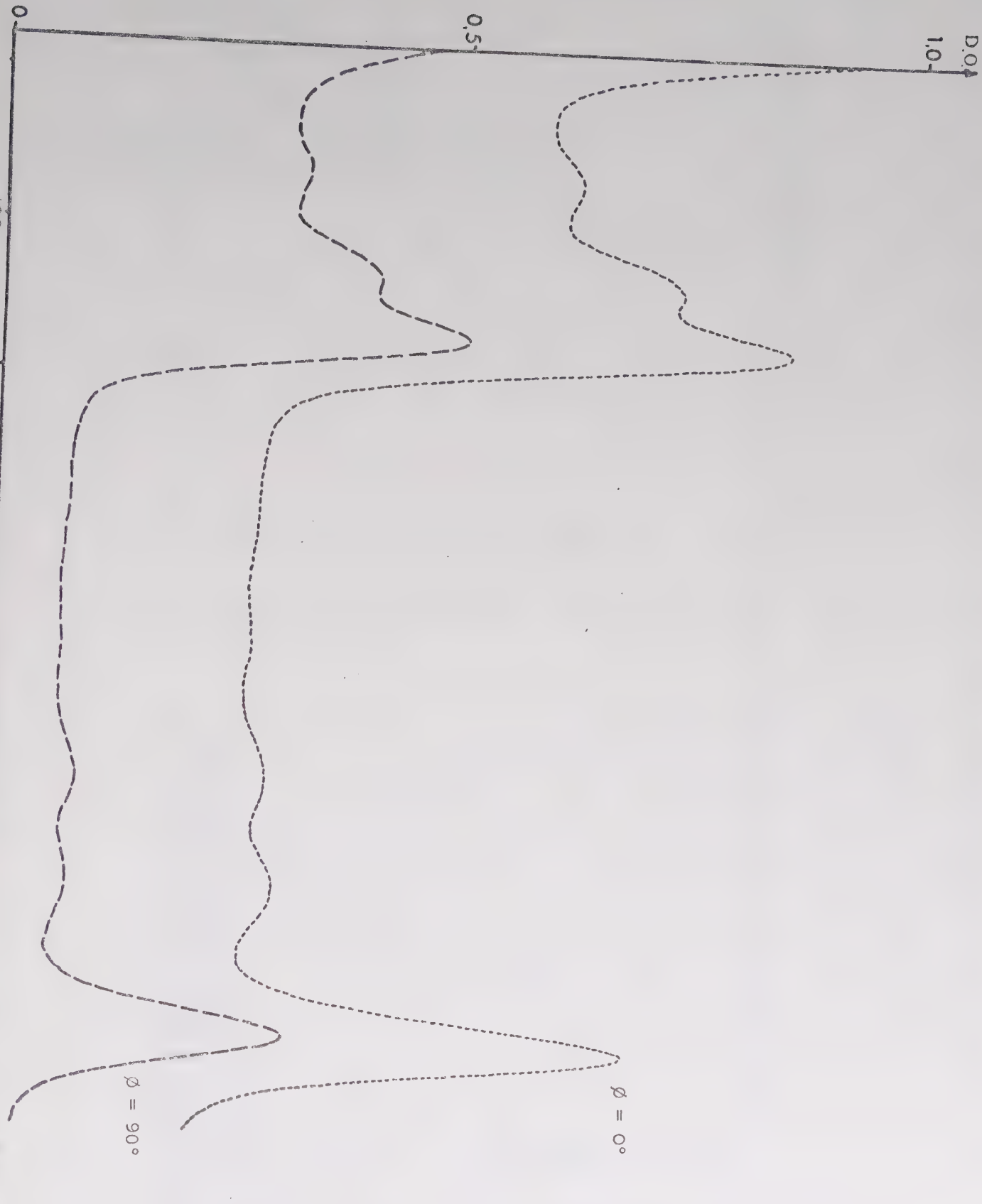


Fig. IV.16. Evolution du spectre d'absorption de Chla dans K 15 en lumière polarisée.

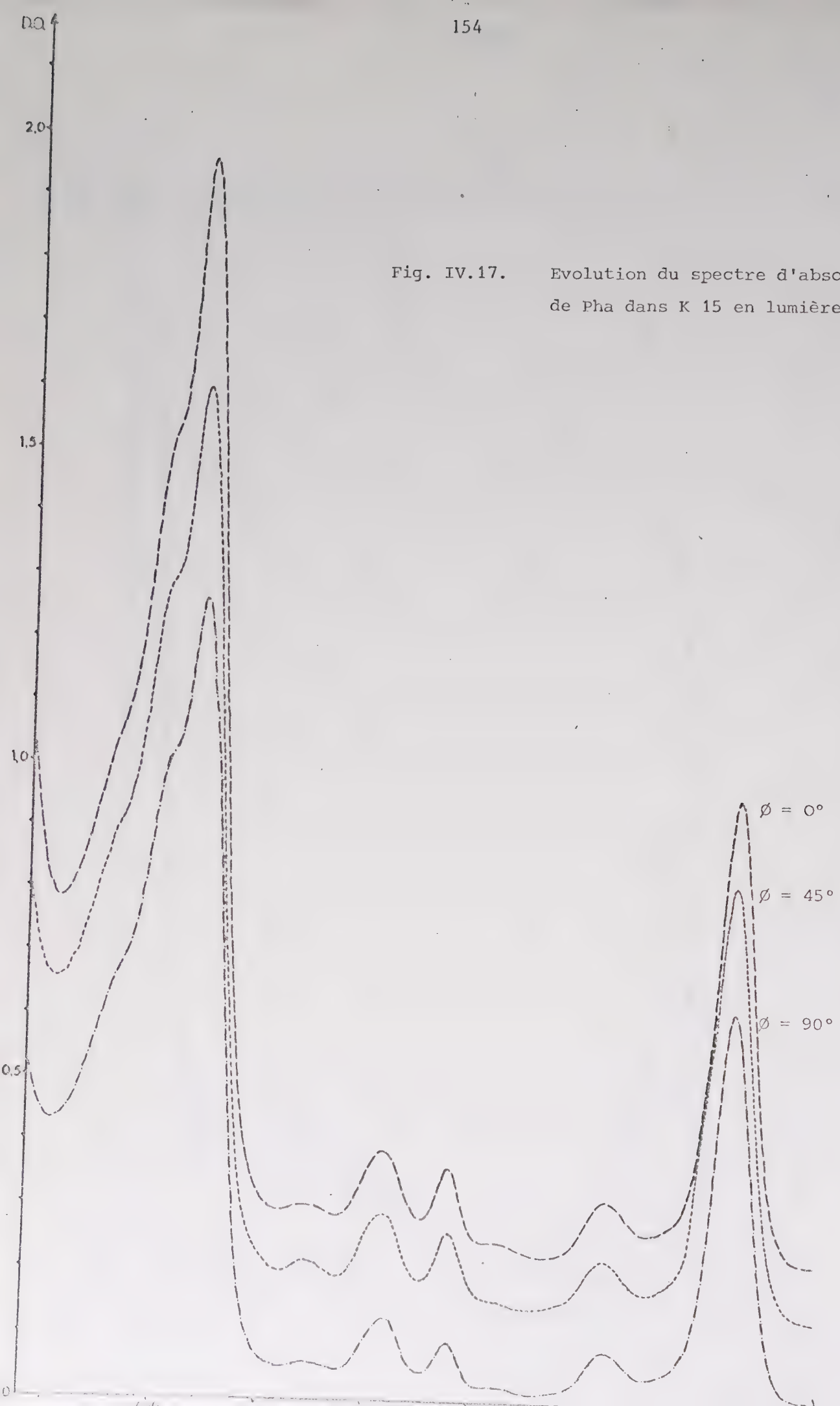


Fig. IV.17. Evolution du spectre d'absorption de Pha dans K 15 en lumière polarisée.

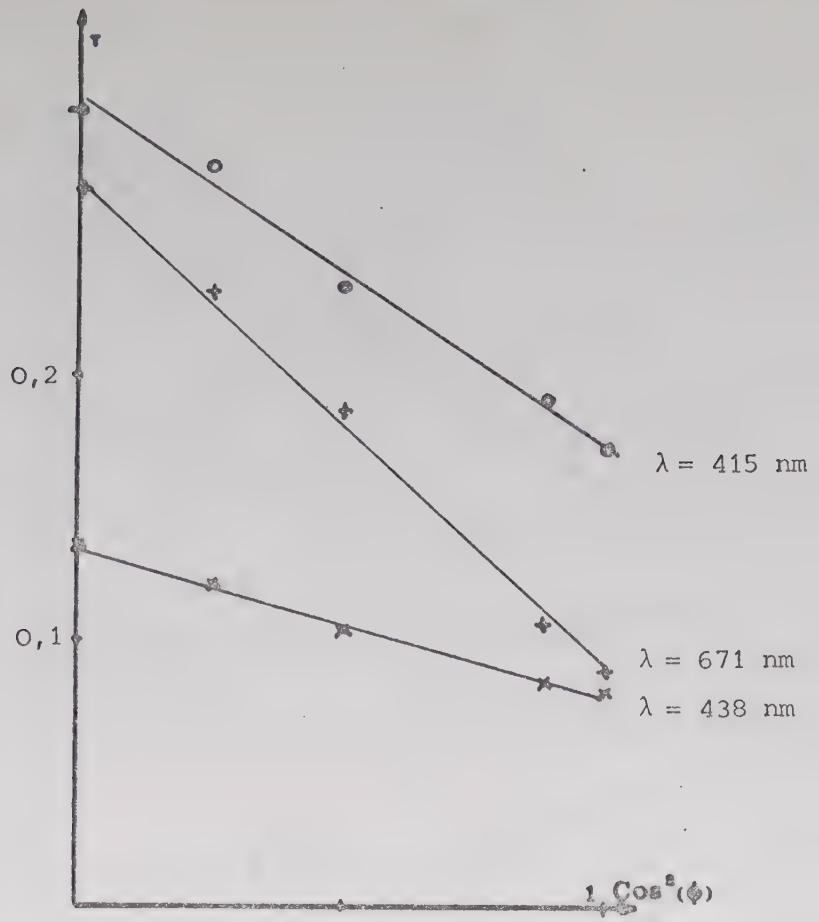


Fig. IV.19 Vérification de la loi de Malus pour Chla dans MBBA.

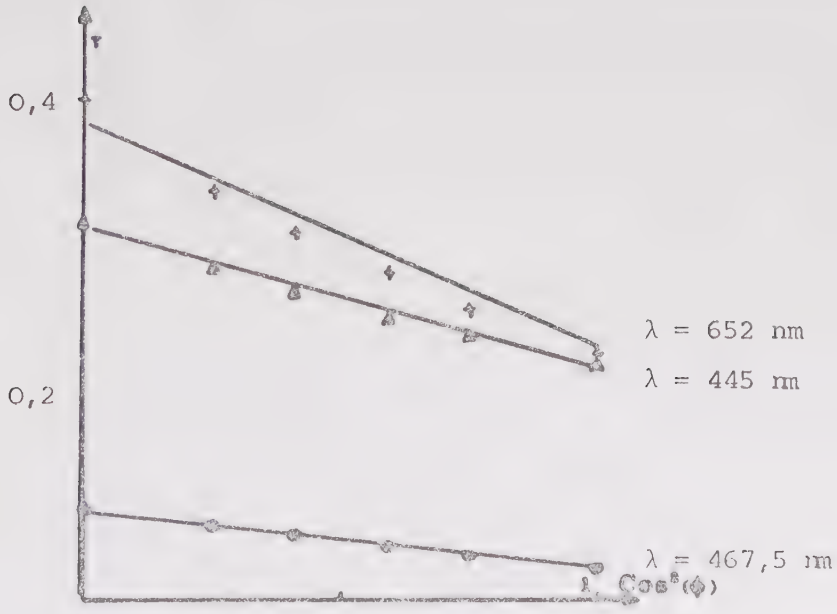


Fig. IV.20. Vérification de la loi de Malus pour Chlb dans MBBA.

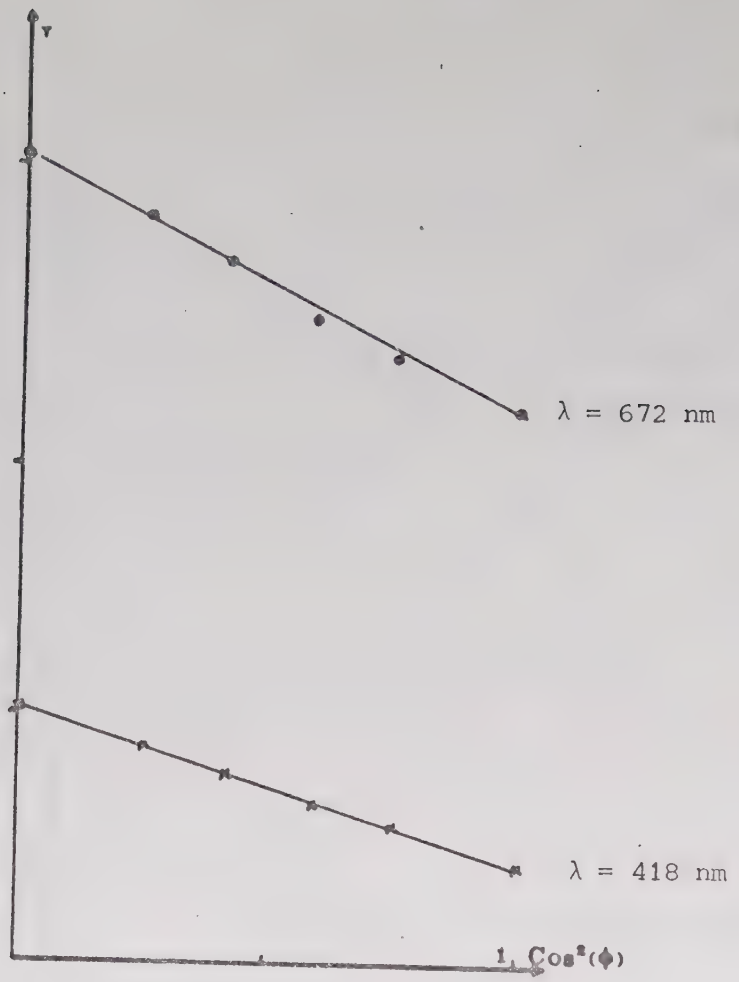


Fig. IV.21. Vérification de la loi de Malus pour Pha dans MBBA.

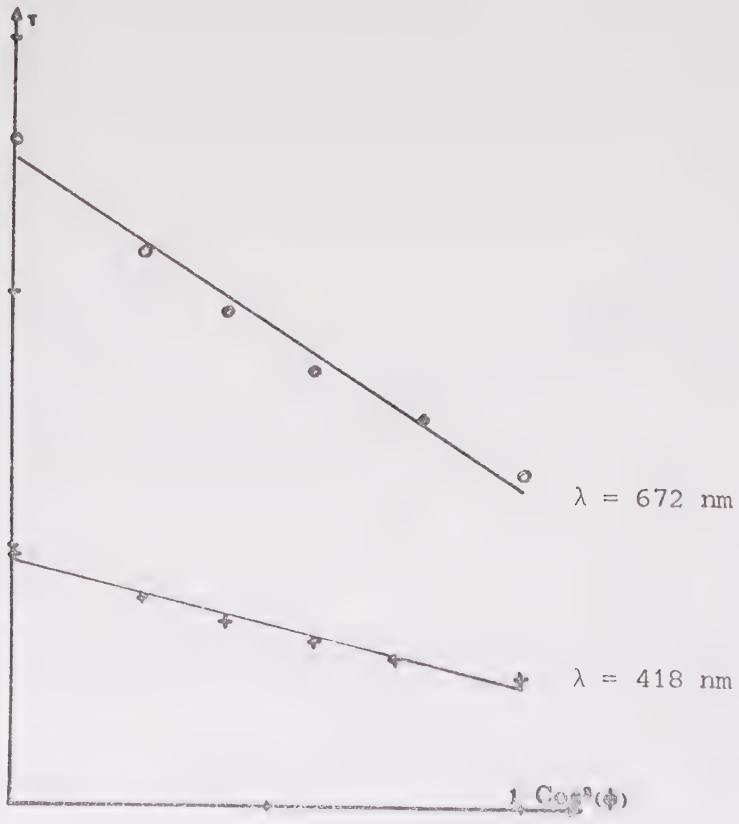


Fig. IV.22. Vérification de la loi de Malus pour MPha dans MBBA.

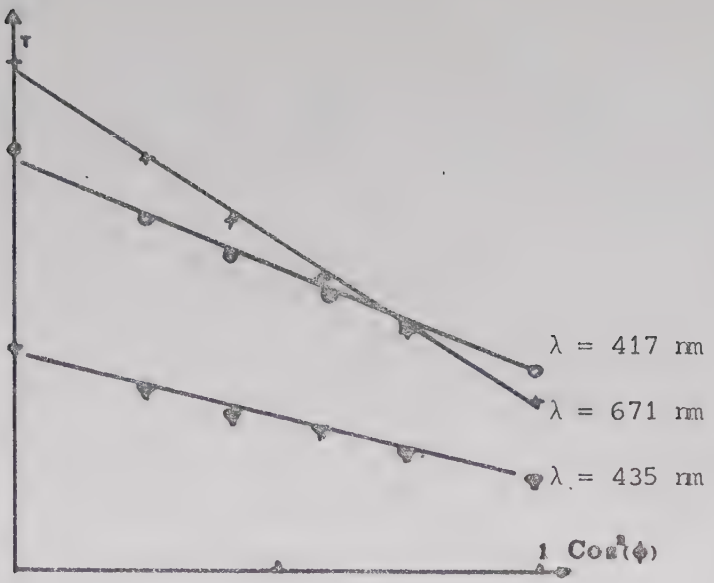
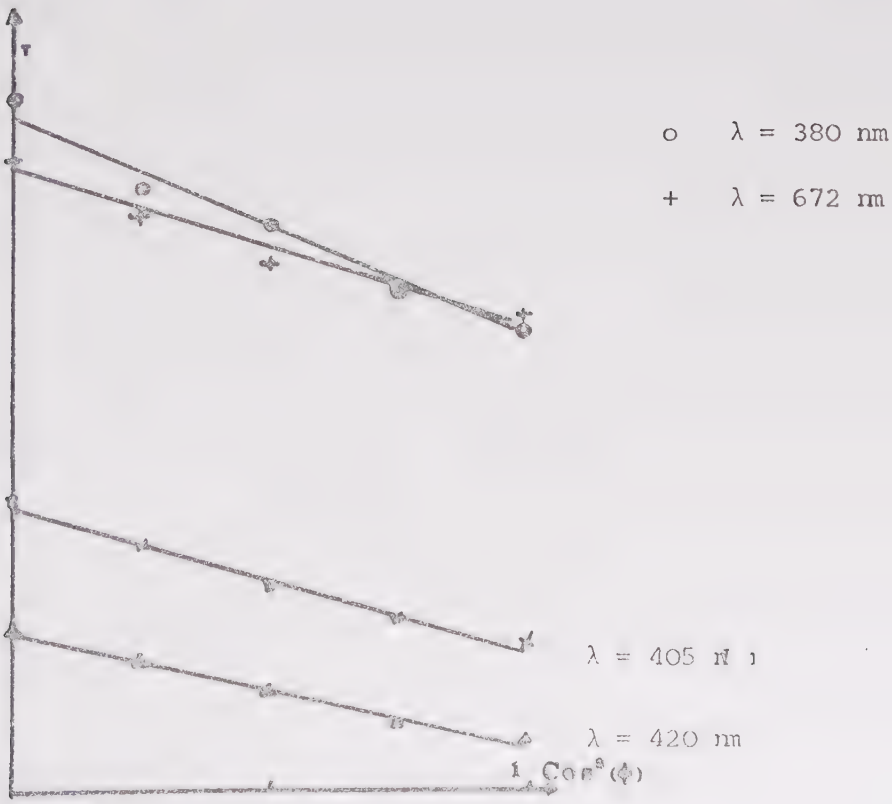


Fig. IV.23. Vérification de la loi de Malus pour Chla dans K 15.

Fig. IV.24. Vérification de la loi de Malus pour Pha dans K 15



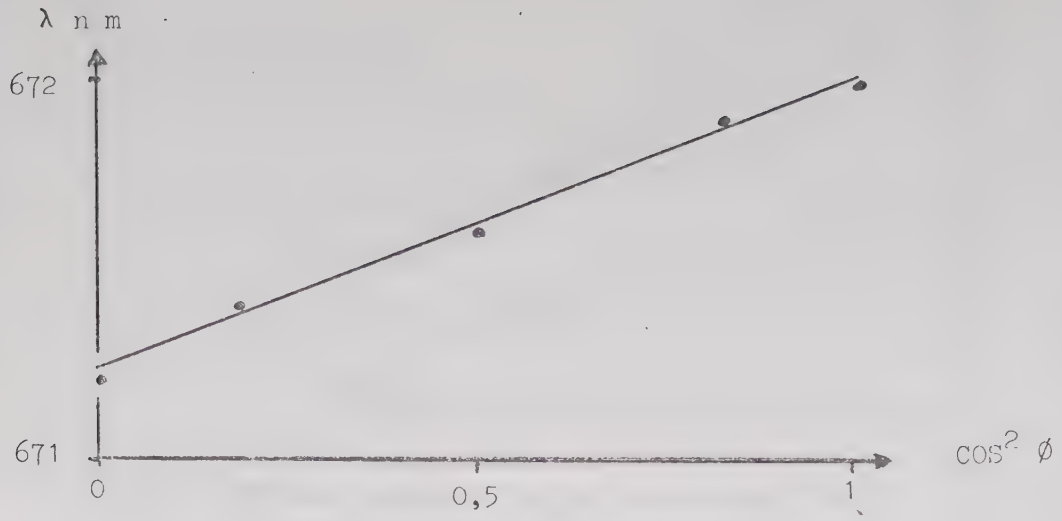


Fig. I. 25 - Evolution du maximum de la bande rouge de Chla dans MBBA avec l'état de polarisation de la lumière incidente.

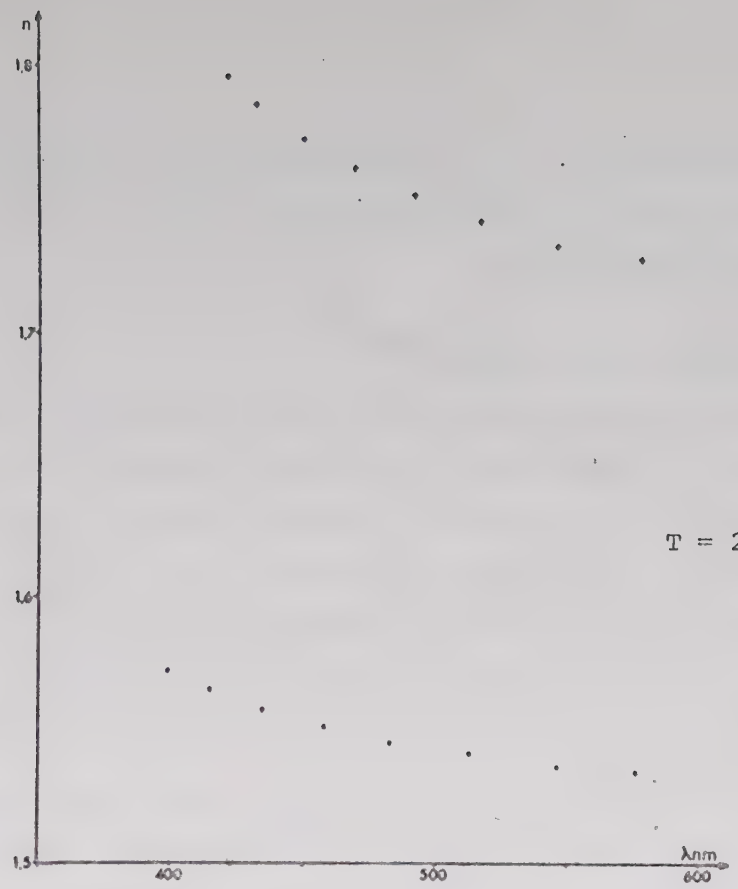


Fig. IV.26. Evolution des indices de K 15 en fonction de la longueur d'onde.

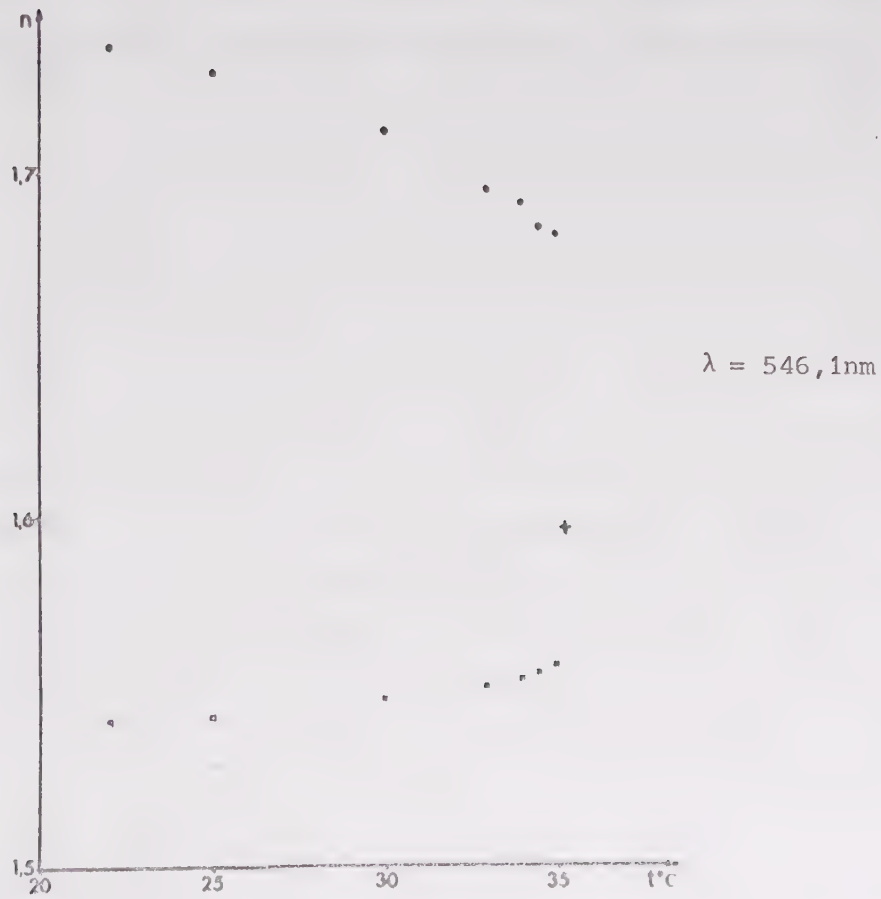


Fig. IV.27. Evolution des indices de K 15 en fonction de la température.

Nous avons donc déterminé S = f(T) (fig. IV.28.) pour le colorant OR. D'autre part, pour chaque solution de pigment nous avons déterminé T_c, d'où T et S pour une température T de travail.

IV.2. Interprétation des résultats

La bande rouge de la chlorophylle et de ses dérivés est simple et correspond à un moment de transition M_1 situé dans le plan de la molécule et passant par les cycles II et III. La relation (3) permet donc de calculer β_1 connaissant F et S. Le tableau IV.4. donne les résultats pour les différents pigments dans MBBA et K15. L'angle β_1 a été également calculé pour la Chla dans MBBA en fonction de la température. Le tableau IV.2. montre le parallélisme entre la diminution du dichroïsme et l'abaissement du degré d'ordre, conduisant à une valeur de β_1 sensiblement constante.

L'évolution de la position du maximum de la bande rouge en fonction de l'état de polarisation de la lumière incidente est une conséquence de l'anisotropie du milieu. En effet, au sein du cristal, le moment M_1 est dirigé suivant une direction à laquelle on peut attribuer un indice n et une constante diélectrique ε . On sait que la position du pic d'absorption d'un colorant dans un solvant polaire dépend de n et ε. Chaque molécule de pigment, dans le cristal anisotrope, possède donc un spectre d'absorption qui dépend de son orientation. Le spectre total de la solution correspond à une "moyenne" prise sur l'ensemble des molécules ; compte tenu de l'anisotropie du milieu, ce résultat moyen dépend de l'orientation du vecteur E de l'onde lumineuse incidente.

Les résultats concernant la bande de Soret sont plus complexes à exploiter. Cette bande est due à deux moments de transition ; l'un M_1 est le même que pour la bande rouge ; l'autre M_2 lui est sensiblement perpendiculaire et passe par les cycles II et IV. La relation (4) doit donc être utilisée, à condition de connaître p. La résolution de la bande de Soret ou ses composantes est difficile car elle fait intervenir plusieurs sous niveaux. De plus, la bande est partiellement perturbée par l'absorption du cristal liquide. Nous avons réalisé une déconvolution (voir chapître III) en choisissant pour les composantes une forme Gaussienne, à partir d'un spectre du pigment dans la pyridine. En effet, dans ce solvant, les bandes ont des positions proches de celles que l'on observe dans le cristal liquide. Les fig. IV.29 à IV.31 et tableau IV.5. donnent les résultats obtenus pour trois pigments (Pha et MPha ont des spectres

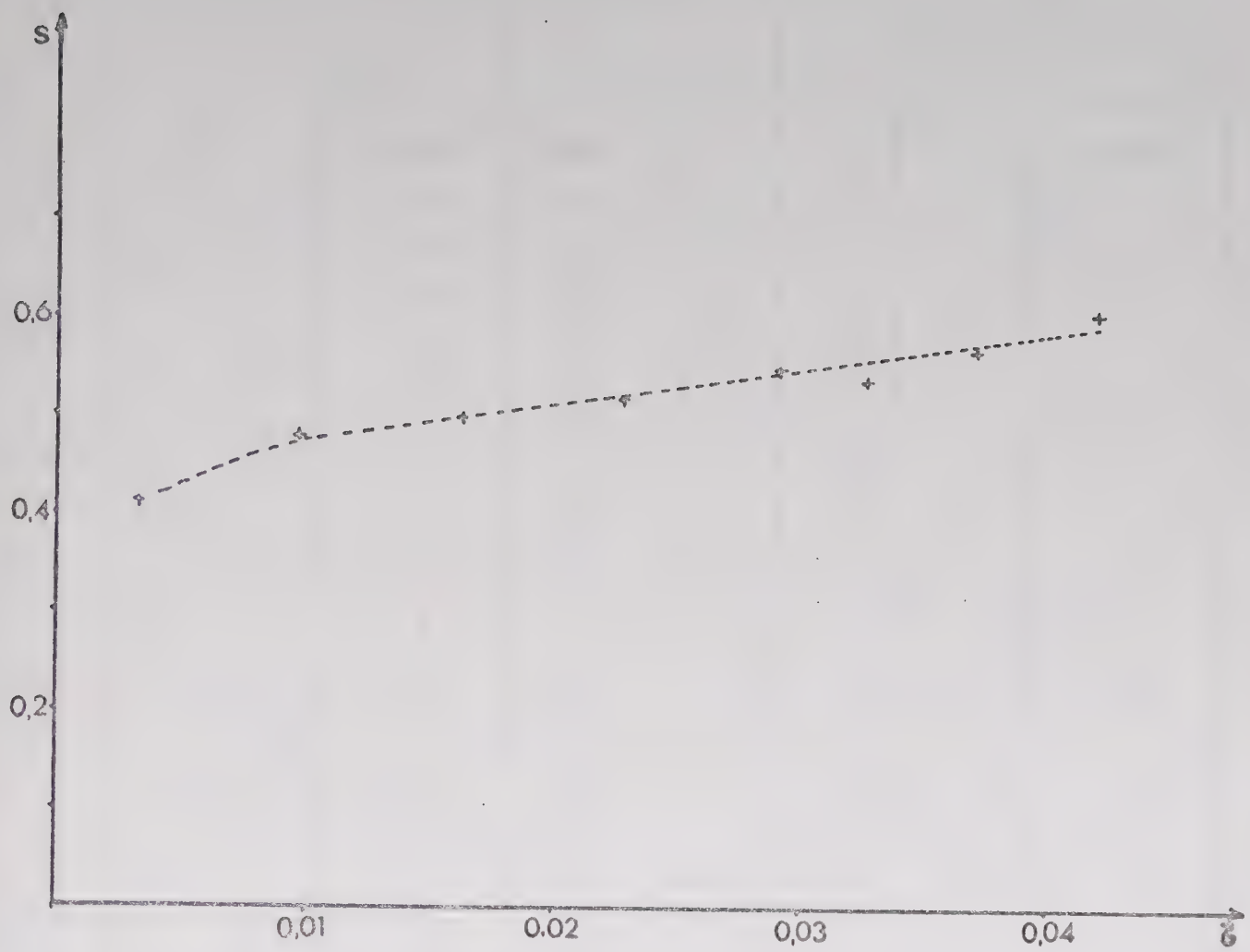


Fig. IV.28 Evolution du degré d'ordre S en fonction de la température réduite $T = \frac{T-T_C}{T_C}$ pour K 15.

Cristal Liquide	Colorant	λnm	F	F'	S	p	β_1°	β_2°
MBBA	Chla	671	1,91	2,16	0,56	1	35,4	
		438	1,26	1,50	0,56	0,2		47,1
		415	1,44	1,73	0,56	0,51		
	Chlb	652	1,85	2,09	0,56	1	36,2	
		467,5	1,39	1,63	0,56	0,23		44,6
		445	1,42	1,68	0,56	0,32		
	Pha	672,0	1,30	1,47	0,56	1	45,3	
		418	1,40	1,68	0,56	0,25		40,8
	MPha	672	1,50	1,69	0,56	1	41,8	
		418	1,28	1,54	0,56	0,25		44,9
K15	Chla	671	1,64	1,84	0,54	1	39	
		435	1,37	1,57	0,54	0,2		44,3
		417	1,43	1,69	0,54	0,57		
		380	1,5	1,76	0,54	0,77		
	Pha	672	1,23	1,37	0,51	1	46,3	
		420	1,40	1,60	0,51	0,25		40,6
		405	1,31	1,51	0,51	0,53		
		380	1,32	1,53	0,51	0,47		

Tableau IV. 4. - Valeurs expérimentales de β_1 β_2 et p déduites du dichroïsme de la bande rouge et de la bande de Soret.

	Bande	a	λ_m nm	δ nm	Polarité
Pha	1	0,715	4193	99	⊥
	2	0,25	4114	93	∥
	3	0,56	3920	95	∥
	4	0,28	3847	95	⊥
	5	0,3	3720	95	∥
Chla	1	0,71	4442	80	⊥
	2	0,41	4313	95	∥
	3	0,42	4180	88	⊥
	4	0,205	4060	90	⊥
	5	0,34	3910	115	∥
Chlb	1	0,78	4749	115	⊥
	2	0,272	4680	80	∥
	3	0,16	4555	90	∥
	4	0,36	4435	115	⊥
	5	0,13	4200	100	

Tableau IV - 5 - Résultats de la déconvolution des bandes de Soret pour Chla, Chlb, Pha.

a = Amplitude de la bande composante (unité arbitraire)

λ_m = Longueur d'onde du maximum de la bande

δ = Longueur à mi-hauteur de la bande

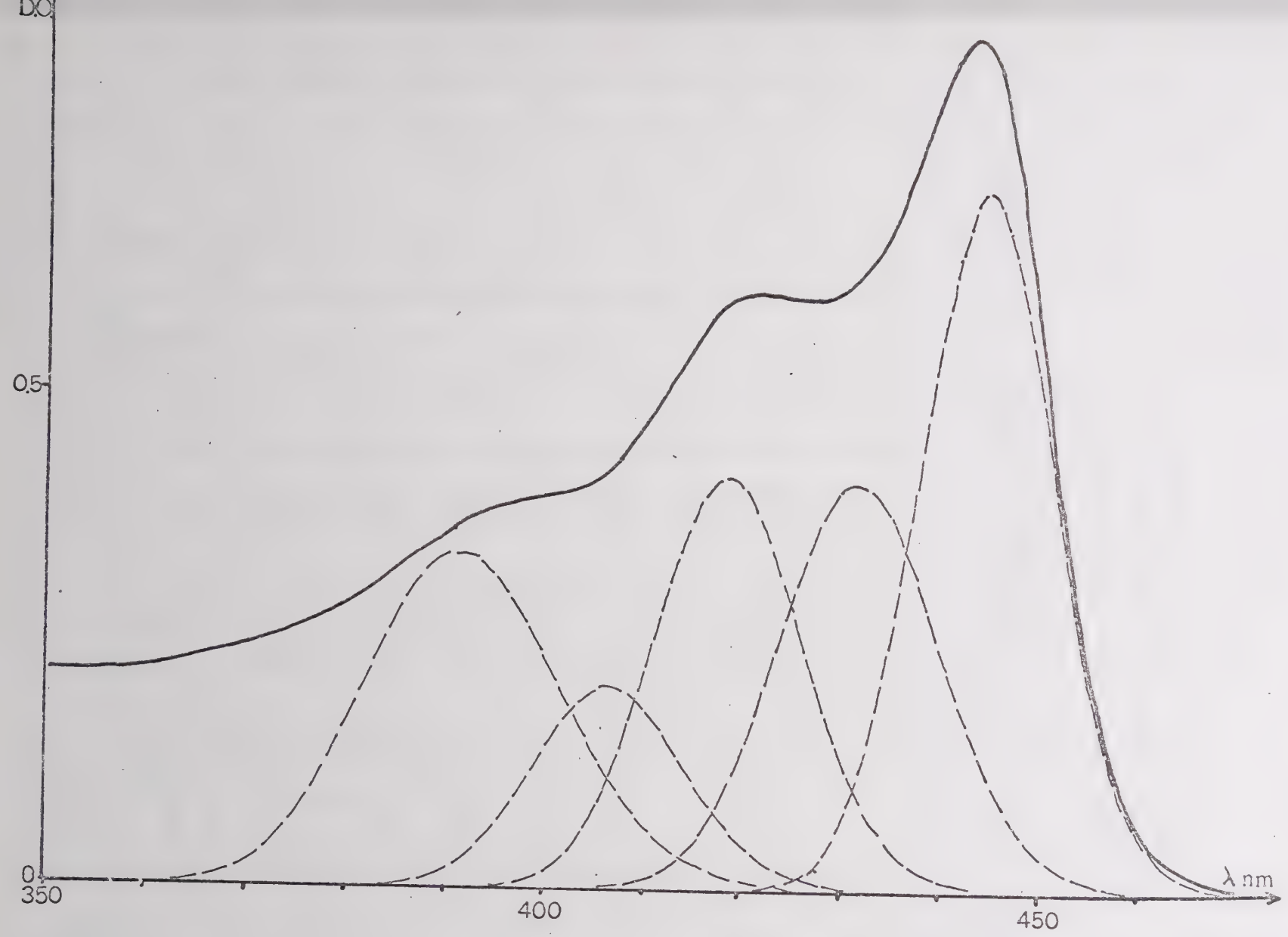


Fig. IV.29. Déconvolution de la bande de Soret de Chla dans la pyridine.

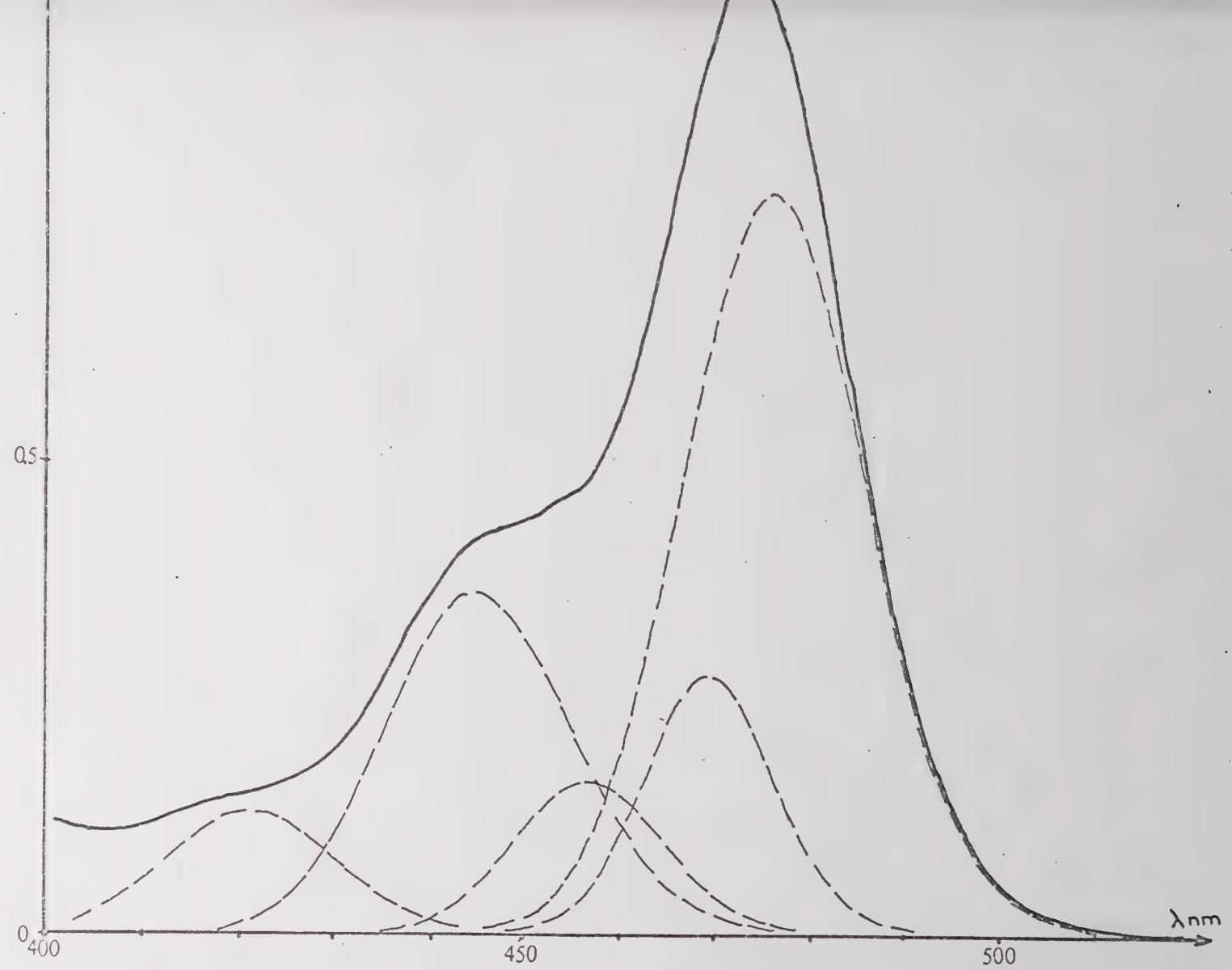


Fig. IV.30 Déconvolution de la bande de Soret de Chlb dans la pyridine.

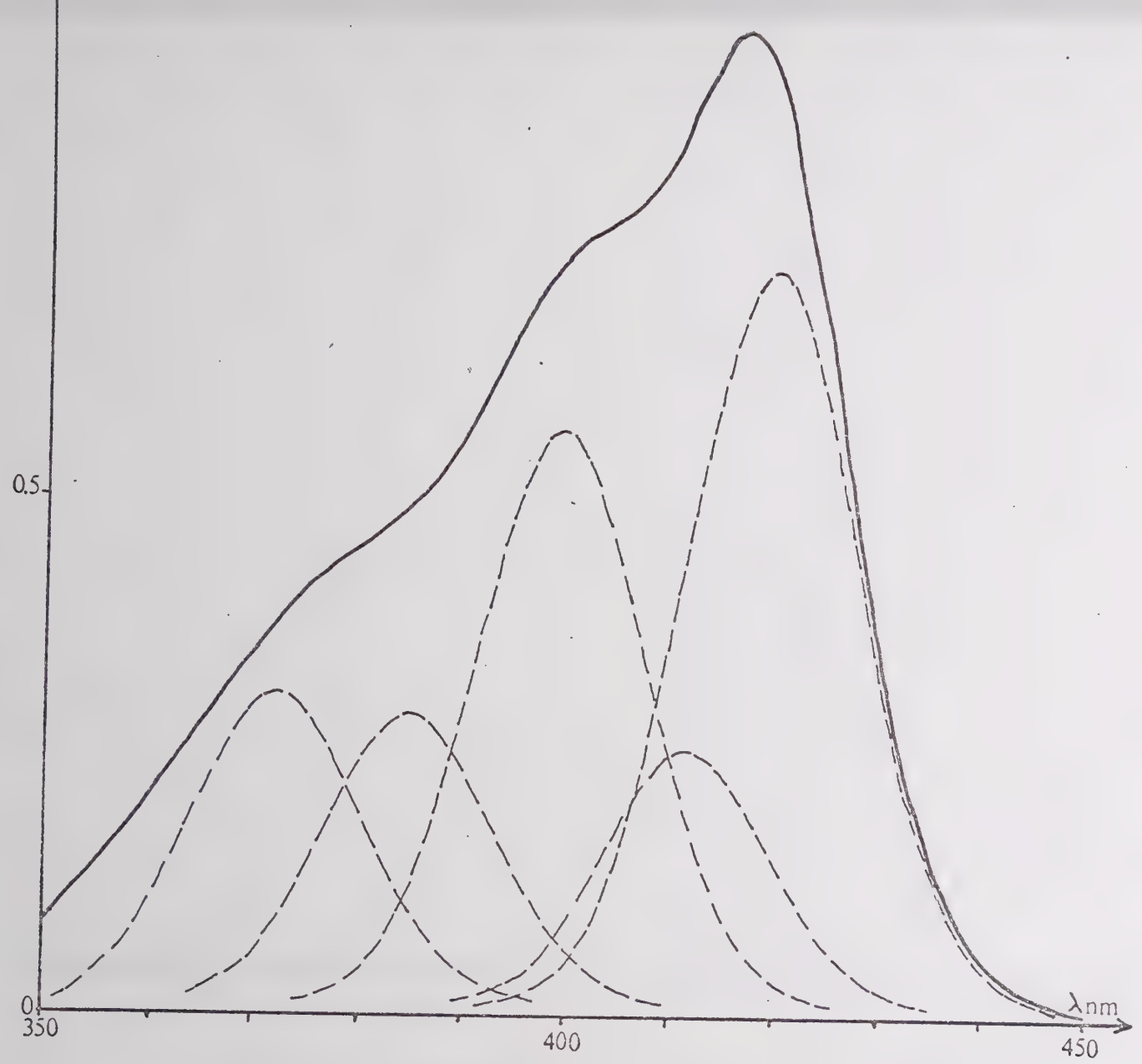


Fig. IV.31. Déconvolution de la bande de Soret de Pha dans la pyridine.

pratiquement indiscernables).

En accord avec les résultats théoriques et expérimentaux connus, nous avons supposé que la première bande de Soret est due à M_2 et la deuxième à M_1. Les bandes suivantes n'intervenant pratiquement plus au niveau du premier maximum, on peut calculer pour ce maximum la valeur de p. L'angle β_1 étant connu par l'étude de la bande rouge, β_2 reste la seule inconnue dans la formule (4). Le tableau IV.4. donne les résultats pour β_1 et β_2 pour les pigments dans les deux cristaux liquides étudiés. On peut remarquer que $\beta_1 + \beta_2 \simeq 90°$, ce qui est en accord avec les résultats connus.

Les autres maxima de la bande de Soret sont bien visibles dans K15. Pour ces maxima, β_1 et β_2 sont connus, donc on peut en déduire p à partir de la relation (4). Le tableau IV.4. donne les valeurs de p ainsi calculées. Ce résultat est important car il va permettre d'attribuer aux autres composantes le moment de transition qui leur donne naissance. Dans le tableau IV.6. nous donnons pour les maxima secondaires, la densité optique (en unité arbitraire) de chacune des composantes de la déconvolution. Suivant que chaque composante est attribuée à M_1 ou à M_2, différentes valeurs de p sont possibles. Les valeurs de p indiquées dans le tableau IV.6. sont obtenus pour un certain choix de ces attributions (// signifie que la composante est due à un moment parallèle à M_1, $\perp$ pour un moment parallèle à M_2). Ce choix n'est pas arbitraire ; c'est celui qui donne à p les valeurs les plus proches des valeurs trouvées expérimentalement.

Pigment		Bande 1	2	3	4	5	p
Chla	1er max	137	34	0	0	0	0,2
	2e max	0	45	70	5	0	0,38
	3e max	0	0	0	13	63	0,83
		⊥	∥	⊥	⊥	∥	
Chlb	1er max	150	45	0	0	0	0,23
	2e max	0	0	20	60	0	0,25
		⊥	∥	∥	⊥	?	
Pha	1er max	128	42	0	0	0	0,25
	2e max	7	16	111	11	0	0,87
	3e max	0	0	5	47	38	0,49
		⊥	∥	∥	⊥	∥	

Tableau IV.6. Valeurs théoriques de p pour un choix de polarité des composantes des bandes de Soret.

AIZAWA M., SUZUKI N., HIRANO M., SUZUKI S.
Electrochimica Acta 23 (1061) 1978

AZZAM R.M.A., BASHARA N. M.
Jal. Opt. Soc. Amer. 62 (1252) 1972

AZZAM R.M.A.
Jal. Opt. Soc. Amer. 68 (1756) 1978

AZZAM R.M.A., BASHARA N. M.
Ellipsometry and polarized light
North Holland Publishing Comp. 1977

BERREMAN D. W.
Jal. Opt. Soc. Amer. 62 (502) 1972

BLINOV L. M., KIZEL V.A., RUMYANTSEV V.G. TITOV V. V.
Kristallografiya 20 (1245) 1975

CHATELAIN P.
Bull. Soc. Franc. Minéral. 66 (105) 1973

CHERRY R. J., KWAN H., CHAPMAN D.
Biochim. Biophys. Acta 267 (512) 1972

COLE H. S., AFTERGUT S.
Jal. Chem. Phys. 68 (826) 1978

CONNERS G. H.
Jal. Opt. Soc. Am. 58 (875) 1968

CONSTANT J., KIRTON J., RAYNES E. P., SHANKS I. A., COATES D., GRAY G. W., MAC DONNEL D. G.
Elect. Letters 12 (514) 1976

DE VRIES H.
Acta Cryst. 4 (219) 1951

DUNMUR D. A.
Chem. Phys. Lett. 10 (49) 1971
Mol. Phys. 23 (109) 1972

FRACKOWIAK D., BAUMAN D., MANIKOVSKI H., MARTYNSKI T.
Biophys. Chem. 6 (369) 1977

HEILMEIER G. H., ZANONI L. A.
App. Phys. Lett. 13 (91) 1968

HILTROP K., STEGEMEYER H.
Ber. Bunsenges. Phys. Chem. 82 (884) 1978
Mol. Cryst. Liq. Cryst. 49 (61) 1978

HOCHAPFEL A., HIVER J. A., VIOVY R.
C. R. Acad. Sci. Sér. C 272 (1265) 1971

HOFF A. J.
Photochem. Photobiol. 19 (51) 1973

JONES R. C.
Jal. Opt. Soc. Am. 31 (488) 1941
Jal. Opt. Soc. Am. 38 (671) 1948

JOURNEAUX R., VIOVY R.
Photochem. Photobiol. 28 (243) 1978

JOURNEAUX R., LAURENT M., VIOVY R.
Optics Comm. 38 (330) 1981

KAHN F. J., TAYLOR G. N., SCHONHORN H.
Proc. I E E E 61 (823) 1973

KRONBERG B. D., GILSON F. R., PATTERSON D.
Jal. Chem. Soc. Farad. Trans II 72 (1673) 1976

LAURENT M., JOURNEAUX R.
Mol. Cryst. Liq. Crist. 36 (171) 1976

MARATHAY A. S.
Jal. Opt. Soc. Am. 61 (1363) 1971
Optics Comm. 3 (369) 1971

NITYANANDA R., KINI U. D., CHANDRASECKHAR S., SURESCH K. A.
Liq. Cryst. Proc. Int. Conf. Bangalare p 325 1973

SACKMAN E., VOSS J.
Chem. Phys. Lett. 14 (528) 1972

SCHELLMAN J. A.
Chem. Rev. 75 (323) 1975

TAUPIN D.
Jal Physique 30 (C4.32) 1969

TAUPIN D., GUYON E., PIERANSKI P.
Jal Physique 39 (406) 1978

TWEET A. G., GAINES Jr G. L., BELLAMY W. D.
J. chem. Phys. 40 (2096) 1964

URBACH W., BOIX M., GUYON E.
Appl. Phys. Lett. 25 (479) 1974

WHITE D. L., TAYLOR G. N.
Jal. Applied Phys. 45 (4718) 1974

CONCLUSION

Cette étude a montré l'intérêt des modèles réalisés in vitro pour essayer de mieux comprendre les phénomènes in vivo intervenant dans la photosynthèse.

Deux voies ont été ainsi explorées :

. La création de milieux où la chlorophylle s'organise et tend à former des agrégats. Un de ces modèles, le dimère, est d'un intérêt particulier car il est présent in vivo et constitue le dernier relai énergétique au niveau de l'unité photosynthétique. Notre étude a montré que le dimère obtenu en solution apolaire diluée était compatible avec le modèle asymétrique de KATZ.

Une extension possible de l'étude de ce modèle est à chercher du côté de la photochimie. Les études photochimiques menées au laboratoire sur les pigments végétaux montrent l'importance du milieu réactionnel et de la disposition du pigment dans ce milieu (CHAUVET et al 1981).

. La création de milieux où le chlorophylle est orientée par un milieu anisotrope : les cristaux liquides.
Ce modèle nous a permis d'apporter des précisions sur le caractère complexe de la bande de Soret. La même étude pourrait être étendue à d'autres substances. Là encore, une extension du modèle peut être envisagée.

D'un point de vue purement physique, il pourrait être intéressant de passer aux cristaux liquides smectiques ; leur organisation sous forme de plan permettrait de mieux s'approcher du modèle de la membrane thylakoïde.

D'un point de vue photophysique, des études récentes montrent l'importance des cristaux liquides pour l'obtention de films et la constitution de pôles pour la tranformation de l'énergie lumineuse en énergie électrique (AIZAWA et al 1981).

Enfin, de tels milieux sont également intéressants pour une étude photochimique des pigments. Le caractère organisé du milieu permet de placer en position définie des molécules capables d'interagir.
Une catégorie de milieux anisotropes pourraient en particulier être utilisés : les milieux lyotropes. Par leur nature chimique et leur structure ils sont un bon modèle pour l'étude des phénomènes biologiques et pour certains applications des phénomènes de catalyse micellaire.

AIZAWA M., YOCHITAKE J., SUZUKI S. Mol. Cryst. Liq. Cryst. 70. (129) 1981

CHAUVET J.P., VILLAIN F., VIOVY R. Photochem. Potobiol. 34. (557) 1981

La composition, le tirage et le brochage
de cette thèse ont été réalisés par
le Centre de reprographie de
l'E.N.S. de Saint-Cloud
1982